



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



Metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *Digitalis purpurea* L. mediante el sistema Cre/lox

Tesis en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología Vegetal

Autora: Lic. Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz

Tutor: Dr. C. Borys Chong Pérez

Santa Clara, 2013



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



Metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *Digitalis purpurea* L. mediante el sistema Cre/lox

Tesis en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología Vegetal

Autora: Lic. Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz

Tutor: Dr. C. Borys Chong Pérez

Laboratorio de Metabolitos Secundarios

2013

«El misterio divino de la vida es su sencillez»

Hans-Georg Gadamer

A mi abuela (Bubi) y a mis herman@s,

las razones sobran...

Muchas gracias a todas las personas que a lo largo de estos de dos años han colaborado con mi formación y la terminación de este documento de tesis, particularmente a todos los trabajadores del IBP, que siempre me han recibido amablemente como si fuera parte del centro. Sin embargo, hay nombres que no puedo dejar de mencionar, porque su apoyo ha sido vital durante este tiempo:

- Mi tutor que, con una mezcla increíble entre exigencia y comprensión, ha sido el impulsor de todo este trabajo, incluso en los momentos más difíciles,
- Alina, Anabel y Naivy, por todas las horas de sabiduría compartidas, su buen carácter y optimismo, tan necesarios y reconfortantes en los instantes catastróficos,
- A todos los profesores de la Maestría en Biotecnología Vegetal y mis compañeros de edición (Nadine, Mairénys, Pedro *the secret weapon*, Adolfo y Mayelín), que con su carisma hicieron agradables e interesantes los cursos, las evaluaciones y los momentos de estrés,
- Sir Luiso (adversario digno como oponente de este documento de tesis) y Madame Baby, pilares del Laboratorio de Biología Molecular, por su colaboración inmediata siempre que ha sido necesario,
- A todos mis compañeros del Departamento de Biología, muchos de los cuales han tenido que asumir algunas de mis responsabilidades (sí, Dianella, es contigo), particularmente a Katia, Orelvis, Daymí, Alán y Alexei, que además son amigos geniales y han realizado de buen gusto revisiones rápidas, dado excelentes consejos y resuelto pacientemente conflictos estadísticos,
- A Tonito, el mejor administrador que un usuario puede desear y tío favorito de Lilith (la inmortal), por soportar mis despistes y desastres informáticos,
- En un plano más personal quiero agradecerle inmensamente a mi familia en todas partes, por su apoyo incondicional, todo el cariño y la atención constante que me profesan. Mi mamá, que es mi mayor ejemplo; mi papá que no puede evitar que nos parezcamos a él y a mis ojos es capaz de resolver cualquier problema. Mi abuela Bubi que con su paciencia infinita nos ha educado y mis hermanos que son el mayor regalo que me ha hecho la vida. A Olguita por su amabilidad y el despliegue logístico en los días finales,
- Mis amigos cerca o lejos, que son un tesoro y los extraño todos los días, principalmente a mis ángeles Yasser, Rinier, Noel, David, Yisel y Nani que nunca están lejos. A Rafa por la nube, mi sitio irreal favorito,
- Por último, precisamente por su importancia, a Elio Jiménez mi primer tutor, que me trajo al Instituto cuando era una estudiante, definiendo mi especialización en esta rama, su ausencia es notable,

A todos, una vez más, muchas gracias...

RESUMEN

Las plantas del género *Digitalis* se caracterizan por producir glucósidos cardiotónicos, medicamentos extensamente empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Debido a que la transformación genética se considera una alternativa para potenciar la producción de metabolitos secundarios, se ha desarrollado un protocolo de modificación vía *Agrobacterium tumefaciens* de discos foliares de *Digitalis purpurea*. En este trabajo se seleccionó la mínima concentración letal de higromicina B (12 mg/L), durante la fase de inducción de callos, para su empleo como agente selectivo. Sin embargo, los genes relacionados con la resistencia a antibióticos no son necesarios luego del proceso de selección, además afectan la percepción pública y provocan problemas tecnológicos. Con el objetivo de desarrollar una metodología para la escisión de genes marcadores de selección en plantas de *D. purpurea*, se empleó el sistema recombinante sitio-específico Cre/lox guiado por un promotor inducible a golpe de calor. Primeramente, se estudió el efecto de la aplicación del golpe térmico (dos veces 2 h con 16 h de intervalo entre ellos) en hojas y callos a 37, 40, 42 y 45°C. No se produjo regeneración de plantas en los explantes sometidos a 45°C, a diferencia de los restantes tratamientos. Los callos tratados a 40°C mostraron características morfológicas significativamente favorables y mayor eficiencia de regeneración, en comparación con los callos y hojas no sometidos a estrés por temperatura. Para comprobar la eficacia de las condiciones propuestas, se transformaron discos foliares de plantas cultivadas *in vitro* con el vector binario pAthsp-A. Luego del proceso de selección, realizado durante la formación y multiplicación de callos, se aplicó el golpe térmico a 40 y 42°C. Diez líneas de plantas regeneradas se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Fue posible comprobar la inducción del promotor y la escisión de los genes marcadores de selección a 42°C, en tres de las líneas. La metodología propuesta puede ser aplicada para la obtención de plantas transgénicas libres de marcadores de selección, que contengan un gen de interés para la sobreproducción de cardenólidos.

ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Digitalis purpurea</i> L.....	4
2.1.1 Origen y clasificación	4
2.1.2 Descripción botánica.....	4
2.1.3 Importancia farmacológica	5
2.2 Cardenólidos	6
2.2.1 Estructura y propiedades farmacológicas	6
2.2.2 Mecanismo de acción	8
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Digitalis</i>	8
2.3.1 Producción de cardenólidos <i>in vitro</i>	10
2.4 Transformación genética en <i>Digitalis purpurea</i>.....	10
2.5 Genes marcadores de selección.....	14
2.5.1 Generalidades	14
2.5.2 Percepción pública de los Organismos Genéticamente Modificados.....	15
2.5.3 Estrategias para obtener plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección	17
2.5.4 Escisión del GMS empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox inducido por golpe térmico.....	21
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de <i>Digitalis purpurea</i>.....	24
3.2. Selección de la temperatura y tipo de explante para la eliminación inducida por golpe térmico del gen marcador de selección	25
3.2.1 Efecto del golpe térmico en hojas de <i>Digitalis purpurea</i>	25
3.2.2 Efecto del golpe térmico en callos de <i>Digitalis purpurea</i>	25

3.3. Obtención de plantas transgénicas de <i>Digitalis purpurea</i> libres de marcador de selección.....	26
3.3.1 Selección y regeneración de plantas transformadas de <i>D. purpurea</i>	31
3.3.2 Análisis mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las líneas de plantas regeneradas	32
Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4. 1. Selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de <i>Digitalis purpurea</i>	34
4.2. Selección de la temperatura y tipo de explante para la eliminación inducida por golpe térmico del gen marcador de selección	38
4.2.1 Efecto del golpe térmico en hojas de <i>Digitalis purpurea</i>	39
4.2.2 Efecto del golpe térmico en callos de <i>Digitalis purpurea</i>	43
4.3. Obtención de plantas transgénicas de <i>Digitalis purpurea</i> libres de marcador de selección.....	54
4.3.1 Selección y regeneración de plantas transformadas de <i>D. purpurea</i>	57
4.3.2 Análisis mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las líneas de plantas regeneradas	59
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Digitalis* se caracterizan por producir metabolitos secundarios conocidos como glucósidos cardiotónicos o cardenólidos. Estos constituyen los medicamentos más extensamente empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Gavidia *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2010) y tienen interés farmacológico creciente, debido a sus potencialidades como anticancerígeno (Sales *et al.*, 2011).

Las enfermedades cardiovasculares afectan la calidad de vida de la población (Richard *et al.*, 2006) y constituyen la primera causa de muerte en Cuba desde 1970 (Oficina Nacional de Estadística de la República de Cuba, 2011). La alta incidencia de insuficiencias cardíacas y arritmias supraventriculares en la población mundial constituida por gerontes (8.1%) (Nation Master, 2011), asociado al aumento de la esperanza de vida, conduce a que los cardenólidos sean medicamentos de uso frecuente.

Hasta la fecha, las plantas del género *Digitalis* son las únicas fuentes económicamente viables para la producción de cardenólidos a escala industrial (Sales *et al.*, 2011). Sin embargo, tanto la producción como el contenido de glucósidos cardiotónicos pueden variar en respuesta a las diferentes estaciones del año y condiciones ambientales (Roca-Pérez *et al.*, 2004). Por tanto, existe un gran interés en el desarrollo de estrategias para fomentar y potenciar la producción de estos metabolitos (Sales *et al.*, 2007;2011). El cultivo *in vitro* ha sido extensamente explorado en este sentido, permitiendo dilucidar que la biosíntesis de los cardenólidos se produce sólo en tejidos verdes diferenciados (Stuhlemmer y Kreis 1996). Basados en estos conocimientos, se obtuvieron niveles apreciables de compuestos digitálicos, mediante la propagación de plantas de *Digitalis purpurea* L. en sistemas de inmersión temporal, aunque todavía menores que los producidos en condiciones de campo (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

Debido a los bajos niveles de cardenólidos obtenidos durante el cultivo *in vitro*, es necesario buscar otras vías atractivas para la potenciación de la producción de estos metabolitos secundarios, como la transformación genética. La expresión de uno o varios genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los cardenólidos o de sus precursores metabólicos, es una alternativa promisoriosa para obtener plantas con una productividad elevada de glucósidos cardiotónicos. Como ventaja

adicional, esta estrategia se podría combinar con otras, como la producción en sistemas de inmersión temporal y/o la elicitación, permitiendo propagar masivamente plantas transformadas con una productividad más elevada y uniforme que la registrada en condiciones naturales.

Para la obtención de plantas modificadas genéticamente son imprescindibles varias condiciones. En primer lugar, un sistema de regeneración que permita obtener plantas a partir de una o pocas células. Seguidamente, un protocolo que posibilite la transferencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) foráneo a las células vegetales, unido a un sistema de selección eficiente para identificar las células que contienen el o los transgenes. Por último, se necesita un gen candidato para el carácter que se quiere modificar.

Hasta la fecha, se ha desarrollado un protocolo para la regeneración de *D. purpurea* a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro* (Occeguera, 2008). Además, se realizaron estudios de los agentes selectivos Geneticina (G418) e Higromicina B en el proceso de formación de callos y en la fase de multiplicación de brotes (Occeguera, 2008). Aunque para la Higromicina B en la fase de callos no se estableció la concentración mínima letal.

Asimismo, se desarrolló un protocolo de transformación en *D. purpurea* vía *Agrobacterium tumefaciens* a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro*. Con su aplicación se obtuvieron plantas que expresan simultánea y establemente los genes *uidA* y *nptII*, que codifican para las enzimas la β -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa, respectivamente. Las células vegetales que expresan el gen *nptII* son resistentes al agente selectivo G418 (Izquierdo, 2010).

Los genes marcadores de selección son imprescindibles para la transformación eficiente de cultivos de interés (Puchta, 2003). Sin embargo, luego del proceso de selección ya no son necesarios. Por el contrario su continua presencia puede afectar la percepción pública y causar problemas tecnológicos. Teniendo en cuenta estos aspectos se han desarrollado diversas estrategias (co-transformación, transposición, recombinación homóloga y recombinación sitio-específica) para eliminar estos genes marcadores del genoma de la planta luego de la selección (Upadhyaya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

La estrategia más versátil para escindir los marcadores de selección es el uso de sistemas de recombinación sitio-específico (Gidoni *et al.*, 2008). Esto se debe, principalmente, a que puede ser

utilizado en cualquier tipo de especie y permite activar la escisión en cualquier momento después de seleccionar las plantas transgénicas. Adicionalmente, la eliminación del gen codificante para el agente selectivo, permite emplear el mismo en transformaciones posteriores (Ramana-Rao *et al.*, 2011), introducir otros genes de interés consecutivamente de forma sitio-específica utilizando el sitio de recombinación remanente (Akbudak y Srivastava, 2011) y simplificar los sistemas de integración complejos (multicopias del transgén) (Ow 2007). En estos sistemas la recombinasa puede ser controlada por promotores inducibles a señales externas, como un golpe térmico. El sistema de recombinación sitio-específico más empleado es el Cre/lox del bacteriófago P1 (Chong-Pérez *et al.*, 2012).

Hasta el momento no existe una metodología para la escisión de marcadores de selección en plantas del género *Digitalis*. El efecto del golpe térmico en diversos explantes de *D. purpurea* y su aplicación en plantas transformadas que contengan un sistema de recombinación sitio-específico, permitirá el desarrollo de un protocolo de eliminación del marcador de selección, para su posterior empleo en la transformación genética con el objetivo de obtener plantas con una sobreproducción de cardenólidos.

Atendiendo a estos antecedentes se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar una metodología para la escisión de genes marcadores de selección, mediante el uso del sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox, en plantas transgénicas de *Digitalis purpurea*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de *D. purpurea*,
2. Seleccionar la temperatura y tipo de explante para su empleo en un sistema de escisión inducido por golpe térmico,
3. Obtener plantas transgénicas de *D. purpurea* libres de marcador de selección, empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox.

Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Digitalis purpurea* L.

2.1.1 Origen y clasificación

La especie *Digitalis purpurea* L. es nativa de Europa occidental, el mediterráneo y el noroeste de África; aunque se ha naturalizado en otras regiones subtropicales o templadas de Europa, Asia, África, América del Sur, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos (Hultén, 1968). Debido a sus propiedades medicinales, se ha intentado introducir en Cuba junto a otras especies del género. En nuestro país su crecimiento en condiciones de campo se produce de manera rápida en otoño e invierno, sin embargo la llegada del verano por lo general ocasiona la muerte de la planta por la ocurrencia de altas temperaturas y abundantes lluvias (Roig, 1974).

La planta es conocida en español con nombres comunes como Dedalera púrpura, Digital o Calzones de zorra. Fue descrita por Linnaeus y en la actualidad se acepta de la siguiente forma (según PLANTS Profile, disponible en <http://plants.usda.gov>):

Reino: *Plantae*

Orden: *Scrophulariales*

División: *Magnoliophyta*

Familia: *Scrophulariaceae*

Subclase: *Asteridae*

Género: *Digitalis* L.

2.1.2 Descripción botánica

D. purpurea es una hierba bienal o perenne, de hasta 2,5 m de altura. Las hojas son alternas, las basales reunidas en una roseta, pecioladas con limbo ovado-lanceolado y margen dentado, densamente pilosas fundamentalmente por el envés, que tiene una coloración grisácea. Presenta una inervación reticular (reticulódromas) muy saliente por el envés e inflorescencia en un largo racimo terminal. Las flores son pedunculadas y algo péndulas, muy vistosas. El cáliz pentámero, verde, corola de 40-55 mm de longitud, en forma de tubo ancho apenas lobulado en la porción distal, de color en el rango desde el púrpura hasta el blanco con manchas oscuras en su interior. Su androceo está formado por 4 estambres didínamos de longitud desigual, fusionados a la corola y cuyas anteras se disponen en la parte superior del tubo de la corola. El gineceo es bicarpelar, con ovario súpero que fructifica en una cápsula de dehiscencia valvar. Florece entre la primavera y el

verano. El fruto es una cápsula que al madurar se abre desprendiendo numerosas semillas de 0,1 a 0,2 mm de diámetro (Renobales, 2001). En el primer año de crecimiento produce únicamente las hojas basales, ovales, dentadas y de peciolo largo mientras que durante el segundo año se desarrolla un tallo largo y cubierto de hojas sésiles y rugosas.

2.1.3 Importancia farmacológica

Se han identificado diversos metabolitos secundarios resultantes de diferentes vías biosintéticas en varios miembros del género *Digitalis*, siendo reconocido como relevante en varias revisiones su contenido en glucósidos cardiotónicos. Sin embargo no se debe desestimar la presencia de muchos otros compuestos fenólicos (flavonoides, antranoides, ácidos fenilpropanoicos) y otros esteroides (esteroles y saponinas) (Sales *et al.*, 2011).

D. purpurea ha sido empleada desde la antigüedad como planta medicinal en el tratamiento de enfermedades cardíacas de manera empírica. Sin embargo, no fue hasta 1785 que William Withering describió sus propiedades medicinales en el tratamiento de la hidropesía, enfermedad caracterizada por la acumulación excesiva de líquido en los tejidos y que en la medicina moderna se reconoce como una consecuencia de la insuficiencia cardíaca (Withering, 1785). En este mismo trabajo también se describían por primera vez los efectos tóxicos derivados de dosis elevadas de preparaciones de la planta. Sin embargo no fue hasta 1799 que la acción farmacológica de *D. purpurea* fue relacionada con su efecto sobre el corazón (Ferriar, 1799). Estudios posteriores demostraron que la digital contiene una serie de sustancias cardiotónicas muy activas de naturaleza esteroideo-glicosídica conocidas comúnmente como glucósidos cardiotónicos o cardenólidos. Además, la planta produce otros compuestos no glucosídicos como la digitoflavina, el ciclohexanol, taninos, ácidos málico y succínico, los cuales complementan la acción de los cardiotónicos (Melero *et al.*, 2000). En la actualidad varios cardenólidos, principalmente la digoxina y sus derivados, son utilizados en la terapia cardíaca. Su importancia es tal que no han podido ser sustituidos hasta la fecha, al menos en el tratamiento a escala industrial (Gavidia *et al.*, 2007).

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en Cuba desde 1970 (Oficina Nacional de Estadística de la República de Cuba, 2011) y afectan la calidad de vida de la población (Richard *et al.*, 2006). La alta incidencia de insuficiencias cardíacas y arritmias

supraventriculares en la población constituida por gerontes (8,1% de la población mundial y 11,7% de la población cubana) (Nation Master, 2011), asociado al aumento de la esperanza de vida, conduce a que los cardenólidos sean medicamentos de uso frecuente para el tratamiento de estas enfermedades.

Investigaciones recientes sugieren que los cardenólidos pueden actuar como componentes reguladores de diversos procesos celulares. Este descubrimiento amplía las aplicaciones terapéuticas de estos compuestos en diversos sectores de interés, como la creación y desarrollo de drogas anticáncer (Nesher *et al.*, 2007; Prassas y Diamandis, 2008). La digitoxina puede inhibir el crecimiento e inducir a apoptosis a las células cancerígenas, probablemente por ser más susceptibles a la inhibición de la glucólisis causada por estos compuestos (López-Lázaro, 2007). Las diversas aplicaciones farmacológicas de estos metabolitos secundarios acrecientan el interés de producir digoxina y digitoxina.

Hasta la fecha, las plantas del género *Digitalis* son las únicas fuentes económicamente viables para la producción de cardenólidos a escala industrial (Hagimori *et al.*, 1980; Sales *et al.*, 2007). Sin embargo, tanto la producción como el contenido de glucósidos cardiotónicos pueden variar en respuesta a las diferentes estaciones del año y condiciones ambientales (Roca-Pérez *et al.*, 2004), por lo que es necesario buscar otras alternativas para su obtención en grandes cantidades y de manera uniforme.

A pesar de los avances en la química sintética, aun son imprescindibles las fuentes naturales para la obtención de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. Este es el caso de la digoxina, que es producida a partir de hojas secas de *Digitalis lanata*, con un costo de alrededor de \$3 000 por kg, debido a que su síntesis química es inviable (Sales *et al.*, 2011). Por tanto son necesarios la domesticación, producción, estudios biotecnológicos y mejoramiento genético de plantas medicinales, como la *Digitalis*.

2.2 Cardenólidos

2.2.1 Estructura y propiedades farmacológicas

Los cardenólidos son moléculas caracterizadas por un núcleo esteroideo (genina o aglicona) que cuenta con un grupo hidroxilo en la posición C14 β y un anillo lactónico insaturado de cinco

miembros en la posición C17 β . Varias de las demás posiciones de la fracción genina pueden tener además sustituyentes como grupos hidroxilo, formilo o acetilo (Herl *et al.*, 2005; Sales *et al.*, 2011). A la posición C3 β se une una cadena de oligosacáridos típicamente de hasta cinco unidades dentro de las cuales es usual encontrar azúcares poco comunes (Melero *et al.*, 2000; Kreis y Müller-Uri, 2013) (Figura 1). Según sus patrones de glicosilación, los cardenólidos se clasifican en primarios, si el azúcar terminal es la glucosa, o secundarios en caso contrario. El núcleo esteroideo tiene la característica peculiar de tener sus cuatro anillos fusionados en la secuencia *cis-trans-cis*, desde el A hasta el D, lo cual les confiere su actividad farmacológica (Melero *et al.*, 2000).

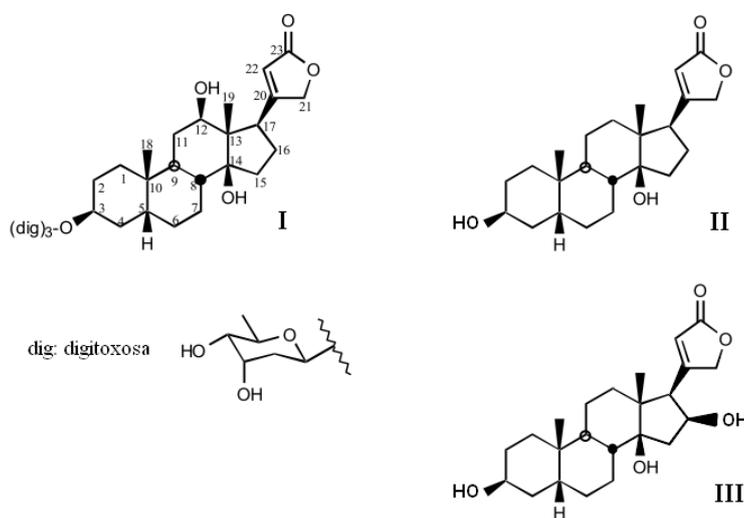


Figura 1. Estructura química de los cardenólidos. Como ejemplo, la digoxina (I) está formada por un núcleo esteroideo (aglicona) y tres unidades de digitoxosa. Las variaciones en el patrón de glicosilación de la aglicona dan lugar a los núcleos esteroideos de la digitoxina (II) y la gigitoxina (III) (Izquierdo *et al.*, 2010).

Las relaciones estructura-actividad de los cardenólidos han sido ampliamente estudiadas. Al respecto se han determinado tres regiones importantes en el reconocimiento por el receptor: el núcleo esteroideo, a través de interacciones hidrofóbicas; el anillo lactónico de la posición C17 β y los residuos de azúcares, estos últimos por interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Thomas *et al.*, 1990). De los tres, el núcleo esteroideo con su conformación característica parece ser el determinante, ya que la unión de las otras dos regiones al receptor depende de la unión previa de la genina (Melero *et al.*, 2000). La farmacocinética de los cardenólidos también depende

en gran parte de su estructura. En cuanto al número de restos de azúcares enlazados, la potencia farmacológica varía en el orden monosacárido-aglicona > disacárido-aglicona > trisacárido-aglicona >> aglicona. En cuanto a la velocidad de absorción, esta es inversamente proporcional a la cantidad de restos de azúcares enlazados (Chiu y Watson, 1985).

2.2.2 Mecanismo de acción

En cuanto a su mecanismo de acción, los glicósidos cardiotónicos pueden ser definidos como inhibidores alostéricos de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Repke *et al.*, 1989; Radzyukevich *et al.*, 2009). La enzima transportadora $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (E.C. 3.6.1.37) está presente en casi todos los tipos de célula del reino animal. Su función es movilizar iones sodio hacia el exterior celular a la vez que transporta iones potasio al interior de la célula con una relación de 3:2, a costa de la hidrólisis de ATP. La bomba mueve ambos iones en contra de su gradiente de concentración, de manera que es la encargada de mantener dicho gradiente, que es responsable de la polarización de la membrana plasmática, así como es utilizado como fuente de energía para el transporte secundario de otros iones y moléculas necesarias para el funcionamiento celular (Aperia, 2007).

De acuerdo con el mecanismo de acción de los glucósidos cardiotónicos (Thomas *et al.*, 1990; Kaplan, 2005), la inhibición de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (alrededor del 30% con dosis terapéuticas) provoca el incremento intracelular de Ca^{2+} en el músculo cardíaco y por consiguiente un aumento en la fuerza de la contracción, conocido como efecto cardiotónico o en algunos casos ionotrópico negativo.

Las dosis elevadas de estos glicósidos provocan la parálisis en cadena de numerosos procesos de transporte secundario que dependen de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, lo cual conduce a la muerte celular y es la base de la toxicidad de estos compuestos. Este hecho, unido a la ubicuidad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en el reino animal, justifica que se haya propuesto como función natural de los cardenólidos repeler herbívoros que traten de alimentarse de las hojas de plantas del género *Digitalis* (Malcolm y Zalucki, 1996).

2.3 Cultivo *in vitro* de *Digitalis*

Por su importancia en la industria farmacéutica las especies del género *Digitalis* han sido objeto de estudio para su cultivo *in vitro*, casi siempre ligadas a la producción de cardenólidos. Para algunas

de estas especies, se han descrito considerables fluctuaciones de productividad y composición de los componentes activos, así como variaciones morfológicas entre individuos. Estas variaciones son atribuidas al relativamente corto tiempo de cultivo de estas especies (a pesar de su extensivo uso a lo largo de la historia), así como la variación en el número de cromosomas y la formación espontánea de híbridos (Neczypor, 1969). De manera que, en los inicios, la exploración del cultivo *in vitro* en dicho género tuvo como finalidad la propagación de líneas de elevada productividad y el desarrollo de métodos de producción de cardenólidos a escala industrial. En 1975 Corduan y Spix desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas a partir de cultivo de anteras de *D. purpurea*. En este trabajo se establecían las condiciones para obtención de callos haploides así como la regeneración y conversión de plantas diploides y tetraploides (Corduan y Spix, 1975).

Hagimori *et al.* realizaron una serie de trabajos en los que se estudiaba el contenido de cardenólidos, durante diferentes etapas del cultivo *in vitro* de *D. purpurea*. (Hagimori *et al.*, 1980). Este mismo grupo de investigadores logró desarrollar suspensiones celulares en condiciones de luz y oscuridad (Hagimori *et al.*, 1982). Otros trabajos dan cuenta de la restauración del potencial regenerativo de cultivos prolongados de brotes de *D. purpurea*, por acción del ácido giberélico (Chaturvedi y Jain, 1994).

Para otras especies del género también han sido desarrollados protocolos de regeneración *in vitro*. Pérez-Bermúdez *et al.* (1984) estudiaron la morfogénesis a partir de explantes foliares de *Digitalis obscura*. Un estudio similar desarrollado por Cacho *et al.* (1991) estableció el potencial morfogenético *in vitro* de explantes de hojas, hipocótilos y raíces de *Digitalis thapsi*. En *D. lanata* han sido establecidos protocolos tanto de organogénesis como de embriogénesis somática (Tewes *et al.*, 1982; Diettrich *et al.*, 1986), mientras que en *D. minor* se han establecido protocolos de regeneración vía organogénesis a partir tanto de tratamiento con reguladores del crecimiento como de la infección de explantes foliares con *Agrobacterium tumefaciens* (Sales *et al.*, 2002).

En *D. purpurea*, además de los trabajos de morfogénesis mencionados, se ha descrito un protocolo completo de regeneración indirecta a partir de explantes foliares (Occeguera, 2008). En este mismo trabajo se realizaron estudios de las concentraciones mínimas inhibitorias de los agentes selectivos higromicina B y geneticina en la fase de inducción de callos.

2.3.1 Producción de cardenólidos *in vitro*

El cultivo *in vitro* comenzó a desarrollarse en especies de *Digitalis* desde hace varias décadas, por las ventajas asociadas a sus facilidades de automatización para la producción de cardenólidos. Sin embargo, dentro de los métodos de producción de biomasa, los intentos de producción mediante cultivos celulares en biorreactores fracasaron (Hagimori *et al.*, 1980; Hagimori *et al.*, 1982). El estudio de las condiciones necesarias para incrementar la producción de cardenólidos se convirtió, por tanto, en una prioridad.

Varios trabajos ya daban cuenta de la baja productividad de las células indiferenciadas (Hirotsu y Furuya 1977; Garve *et al.*, 1980; Hagimori *et al.*, 1980). Estos resultados, conjuntamente con el hecho de que las partes verdes de la planta sean las de mayor producción de cardenólidos (Stuhlemmer y Kreis 1996), condujeron al estudio del efecto de la luz, la presencia de cloroplastos y la diferenciación celular en la productividad de *D. purpurea* (Hagimori *et al.*, 1982b). Estos investigadores encontraron que la organogénesis era el factor primario que determinaba la síntesis de estos metabolitos, mientras que la luz estimula la biosíntesis una vez que los tejidos productores ya están formados. Estudios posteriores en *D. lanata* corroboraron estas observaciones al comprobar que la síntesis *de novo* de cardenólidos en brotes cultivados en la oscuridad, esta ruta anabólica se incrementaba considerablemente al transferir los brotes a la luz (Eisenbeiß *et al.*, 1999).

En consecuencia la producción de biomasa de *D. purpurea* a partir de sistemas de inmersión temporal, se considera la estrategia más viable que combine las bondades del cultivo *in vitro* y los requerimientos de diferenciación celular necesarios para obtener altos niveles de cardenólidos (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

2.4 Transformación genética en *Digitalis purpurea*

La transformación genética es una técnica de mejoramiento con amplias potencialidades de uso en la ingeniería metabólica, por lo que ha sido aplicada con diversos objetivos que incluyen la obtención de resistencia a plagas y enfermedades, la expresión de proteínas foráneas de interés farmacológico, estudios funcionales, entre otros. Su aplicación en cultivos que producen metabolitos secundarios, puede estar encaminada al silenciamiento de genes involucrados en rutas

que comparten los mismos precursores; o al aumento de su producción a partir de la sobreexpresión de proteínas claves en la ruta biosintética que los origina (Capell y Christou, 2004; Giuliano *et al.*, 2008). Esta última se considera la opción más viable para el caso de la *Digitalis*, en consecuencia con los estudios realizados por diversos investigadores acerca de las enzimas involucradas en la síntesis del núcleo esteroide de los cardenólidos y la selección de genes candidatos para la transformación, como la progesterona-5 β -reductasa (Izquierdo *et al.*, 2010; Kreis y Müller-Uri, 2013).

Para la obtención de plantas modificadas genéticamente son imprescindibles varias condiciones. En primer lugar un sistema de regeneración que permita obtener plantas a partir de una o pocas células. Un protocolo que permita la transferencia del ADN foráneo a las células vegetales, unido a un sistema de selección eficiente para identificar las células que contienen el o los transgenes. Por último se necesita un gen candidato para el rasgo que se quiere modificar.

Hasta el momento existen solo unos pocos antecedentes de transformación en *Digitalis* y un protocolo exitoso para la obtención de plantas transgénicas en la especie *D. purpurea*. Los trabajos más sostenidos de transformación en este género han sido realizados en la especie *Digitalis minor*. En un primer intento, Sales *et al.* (2002) describieron la regeneración eficiente de la planta a partir de explantes de hojas infectadas con la cepa 82.139 de *Agrobacterium tumefaciens*. Durante el proceso de infección, el transgén reportero codificante para la subunidad A de la β -glucuronidasa (*uidA*) fue detectado en los tumores inducidos por la bacteria. Sin embargo, ni los brotes y raíces regenerados, ni las plantas obtenidas resultaron transformadas. Posteriormente este mismo grupo de investigadores publicó un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* en esta misma planta, pero esta vez utilizando las cepas EHA105 y AGL1 que contenían el transgén reportero *uidA* y genes marcadores de selección. Los explantes de partida utilizados fueron discos de hojas de plantas cultivadas *in vitro*, empleando acetosiringona como estimulante de la virulencia de *Agrobacterium* en la fase de co-cultivo (Sales *et al.*, 2003). Dicho sistema de transformación fue utilizado para obtener plantas de *D. minor* que sobreexpresaban el dominio catalítico de Hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana* (Sales *et al.*, 2007). Algunas de las líneas obtenidas presentaron un mayor contenido de cardenólidos (hasta un 40%) tanto *in vitro*

como en condiciones de invernadero. Sin embargo, los efectos pleiotrópicos de esta enzima sobre el metabolismo esteroideo ponen en duda su aplicabilidad en la transformación de otras especies del género.

En cuanto a *D. purpurea*, ya en 1990 Saito *et al.* lograron la transferencia de un ADN-T (segmento de ADN transferido por *Agrobacterium* a la célula vegetal) al genoma de esta especie a través de la transformación de discos de hojas de la planta con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria es capaz de inducir la rizogénesis por lo que estos investigadores lograron la generación y el cultivo de raíces transgénicas, sin embargo no lograron la regeneración de plantas completas a partir de estas (Saito *et al.*, 1990).

Basados en estas experiencias un grupo del Instituto de Biotecnología de las Plantas desarrolló un protocolo para la regeneración de *D. purpurea* a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro* (Occeguera, 2008). Además, se realizaron estudios de los agentes selectivos higromicina B y geneticina (G418) en el proceso de formación de callos y en la fase de multiplicación de brotes (Occeguera, 2008). Posteriormente se propuso un protocolo de transformación de discos foliares de *D. purpurea* vía *A. tumefaciens* (Figura 2)(Izquierdo, 2010). Para ello se evaluaron las cepas de *A. tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) y C58C1Rif^R (pMP90) (Koncz y Schell, 1986) transformadas con el plasmidio pTJK136 (Deblaere *et al.*, 1987), que contiene el gen de selección *nptII* y el gen reportero *uidA*, anteriormente empleado en esta especie. La evaluación visual del producto de catálisis de la β -glucuronidasa, permitió analizar la expresión transitoria y estable de esta enzima y comparar ambas cepas. La cepa C58C1Rif^R (pMP90) fue seleccionada como más eficiente para la transformación, debido a la significativa superioridad en la regeneración de los explantes transformados, en comparación con las líneas obtenidas a partir de los explantes transformados con *A. tumefaciens* EHA105.

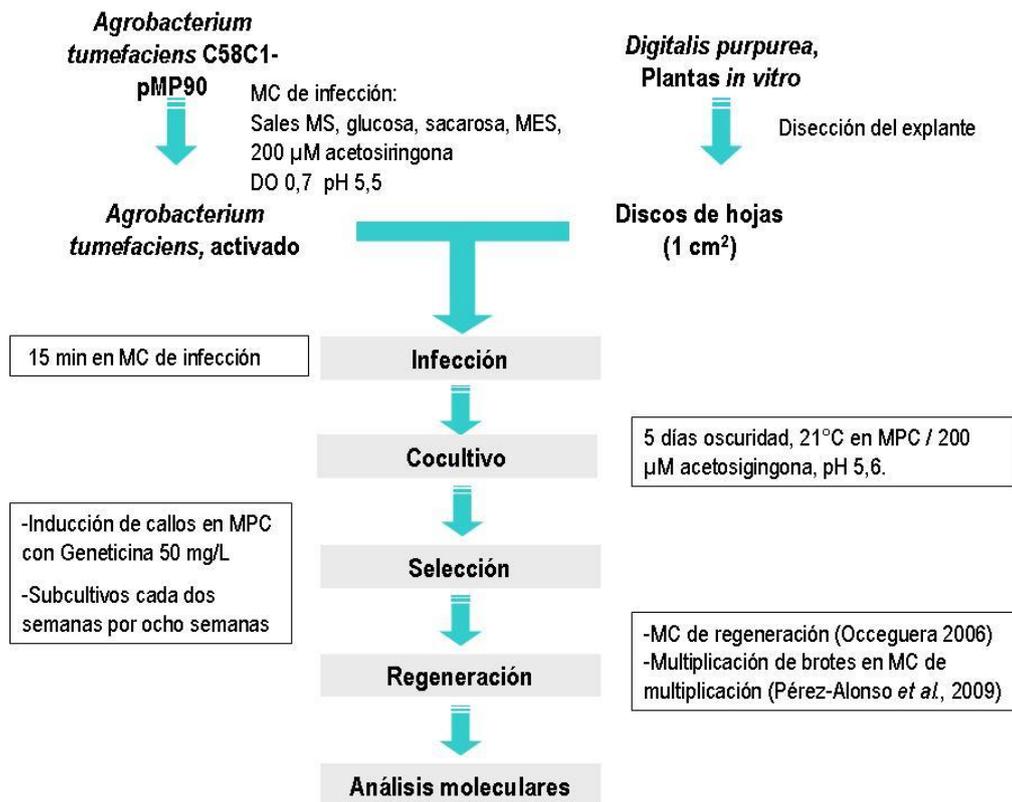


Figura 2. Protocolo de transformación de discos foliares de *D. purpurea* mediada por *A. tumefaciens*. MC: medio de cultivo. MPC: medio de cultivo de proliferación de callos (Izquierdo, 2010).

Los análisis moleculares realizados en el trabajo antes mencionado, permitieron comprobar la obtención de plantas que expresan simultánea y establemente los genes *uidA* y *nptII*, que codifican para las enzimas β -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa. Este último posibilita que las células vegetales sean resistentes a G418, por lo cual se empleó este antibiótico como agente selectivo durante la fase de inducción de callos. Sin embargo, también se obtuvieron líneas que no contenían ambos genes, lo que se corresponde a escapes durante el proceso de selección con geneticina, así como la no aplicación del agente selectivo durante la regeneración de los explantes (Izquierdo, 2010).

Estas evidencias experimentales demuestran que es necesario considerar determinadas modificaciones durante el proceso de selección. Las posibles alternativas incluyen el aumento de la concentración de G418 (>50 mg/L) o el aumento de la duración del proceso de selección. Ambas estrategias poseen como desventaja el crecimiento de los costos asociados al empleo de

geneticina durante tiempos y concentraciones superiores. Otra alternativa, podría ser el empleo de otro agente selectivo de la misma naturaleza, como la Higromicina B.

2.5 Genes marcadores de selección

2.5.1 Generalidades

El desarrollo de un protocolo de transformación genética requiere invariablemente un método de selección de las plantas transformadas. Es por tanto muy común la utilización genes de marcadores de selección (GMS) en los vectores de transformación, que confieren resistencia a herbicidas, antibióticos, u otras condiciones de toxicidad o estrés para la planta (Gelvin, 2003). Permitiendo diferenciar aquellas células, tejidos y plantas que han sido transformados de los que no se modificaron genéticamente.

Los GMS pueden clasificarse en dependencia de si permite el desarrollo del tejido transformado (selección positiva) o causan la muerte de este (negativas). También pueden ser clasificados en condicional o no, si la selección requiere la presencia de sustratos externos o no (Miki y McHugh, 2004).

Los marcadores de selección más comúnmente empleados son positivos y condicionales, puesto que necesitan de la presencia de antibióticos, herbicidas u otros compuestos normalmente tóxicos para las plantas sin transformar.

El gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina, paromomicina y geneticina (G418) (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Por su parte, el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*) confiere resistencia a higromicina B, un aminoglucósido tóxico a la célula vegetal debido a que inhibe la síntesis proteica (Blochlinger y Diggelmann, 1984). El primero de estos antibióticos ha sido empleado en la obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* (Izquierdo, 2010).

Otro ejemplo de selección positiva condicional es el uso de herbicidas. Este sistema tiene la ventaja de que las plantas pueden ser asperjadas para la selección en casa de cultivo o en campo y a su vez puede ser el gen de interés. Sin embargo, posee desventajas entre las que se incluyen su toxicidad y alergenicidad, que pueden causar daños a la salud humana y la seguridad de nuevos

productos comestibles, así como potenciales efectos negativos en organismos que no son su diana (Ramessar *et al*, 2007).

A pesar de la importancia de los GMS, generalmente estos no son necesarios luego del proceso de selección, además de que pueden afectar la percepción pública y causar problemas tecnológicos.

2.5.2 Percepción pública de los Organismos Genéticamente Modificados

El uso y liberación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) ha provocado un intenso debate público con respecto a los alimentos y productos que contienen estos organismos y el riesgo de su consumo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define los OGM, como aquellos organismos en los cuales el material genético ha sido alterado por una vía que no ocurre de forma natural (Domingo y Bordonaba, 2011).

Las evaluaciones para cada cultivo genéticamente modificado (GM) han sido realizadas usando diferentes parámetros, el resultado más común es que tanto los cultivos genéticamente modificados como los convencionales tienen una respuesta similar, lo que se denomina como equivalencia (Magaña-Gómez y de la Barca, 2009).

Los estudios de riesgos de los OGM reflejan la complejidad de este tema. Sin embargo, el público en general desconoce las ventajas o desventajas que ofrece esta tecnología y el amplio rango de aplicaciones que estas pueden tener. Desde la primera generación de los OGM las discusiones se han centrado en el riesgo al ambiente y a la salud humana.

Hasta el momento no existe un consenso en el debate sobre los posibles riesgos que puedan ocasionar los cultivos transgénicos y como minimizarlos (Hills *et al.*, 2007). En este sentido, uno de los aspectos más preocupantes es la posible transferencia de los genes de resistencia a antibióticos, presentes en las plantas transgénicas hacia microorganismos del suelo y las plantas aledañas, mediante la transferencia horizontal génica.

Por otro lado, se encuentra la transformación de bacterias en la cadena alimenticia. El ADN libre persiste en algunos materiales por semanas y en otros casos algunas bacterias desarrollan una competencia química natural para tomar este ADN del medio. Adicionalmente, en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales, el ADN puede permanecer estable durante un tiempo determinado, fundamentalmente en el colon (van den Eede *et al.*, 2004).

La transformación natural constituye el principal mecanismo de transferencia de genes en procariontes. Este consiste en la captación del ADN extracelular y su integración al genoma (de Vries y Wackernagel, 2002). En bacterias presentes en la flora intestinal de humanos y animales podría ocurrir transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos, los cuales se pueden transferir hacia bacterias patógenas y estas a su vez podrían manifestar una determinada resistencia a antibióticos empleados en la práctica clínica. Sin embargo, el riesgo de que esto ocurra es mínimo debido a los procesos de degradación del ADN que ocurren durante la digestión. Por otro lado varios estudios han demostrado en el caso específico del gen marcador *nptII*, que la transferencia horizontal de este gen entre plantas transgénicas y microorganismos no es significativa al ser comparada con la transferencia del gen *nptII* entre bacterias (Miki y McHugh, 2004; Ramessar *et al.*, 2007).

Otra de las consecuencias de la continua presencia de los genes marcadores de selección y sus elementos regulatorios son los efectos pleiotrópicos. En estos la actividad de las enzimas producto de los genes introducidos pueden influir sobre la actividad de otras enzimas (Miki *et al.*, 2009). Además, las secuencias regulatorias de los genes marcadores de selección puede tener influencia sobre los transgenes o genes endógenos que se encuentran cerca de los sitios de inserción (Yoo *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2007).

Por otro lado el escape de genes de resistencia a herbicidas hacia plantas más cercanas es una preocupación. Muchos cultivos transgénicos son compatibles sexualmente con plantas silvestres que se encuentran relativamente cerca a estos cultivos, por lo que podría ocurrir un flujo genético (Ellstrand, 2003). Pero este proceso consta con varias barreras, ya que ambos tienen que crecer en estrecha proximidad, coincidir con la etapa de floración y la progenie debe ser suficientemente fuerte para propagarse (Mallory-Smith y Zapiola, 2008).

Teniendo en cuenta estos aspectos se han desarrollado diversas estrategias (co-transformación, transposición, recombinación homóloga y recombinación sitio-específica) con el objetivo de eliminar estos genes marcadores del genoma de la planta, luego del proceso de selección (Upadhyaya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

2.5.3 Estrategias para obtener plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección

Aunque la mayoría de los GMS empleados son seguros para la salud humana y al medio ambiente y han sido aprobados por agencias regulatorias (Ramessar *et al.*, 2007), una parte importante del público se opone al uso generalizado de los genes de resistencia a herbicidas y antibióticos. Adicionalmente la eliminación de los genes marcadores de selección de las plantas transgénicas permite la retransformación y selección empleando el mismo marcador. En soya (*Glycine max* L.) esta estrategia ha sido usada para introducir consecutivamente dos genes involucrados en la biosíntesis del ácido fático (Eckert *et al.*, 2006).

Existen varias revisiones sobre este tema que reconocen la existencia de diversas estrategias factibles para la eliminación de GMS (e.g. Hohn *et al.*, 2001; Puchta, 2003; Upadhyaya *et al.*, 2010).

En todas se reconocen cuatro estrategias fundamentales:

- I. Co-transformación del GMS y el gen de interés seguido de la segregación y selección de la descendencia libre de marcador,
- II. Localizar el GMS o el gen de interés en un elemento transponible,
- III. Recombinación homóloga,
- IV. Recombinación sitio-específica.

La primera estrategia listada constituye uno de los métodos pioneros empleados para la eliminación del marcador de selección y ha sido revisada por varios autores (Miki y McHugh, 2004; Darbani *et al.*, 2007). Requiere la co-transformación empleando dos vectores diferentes con los casetes de expresión necesarios para el gen de interés y el GMS, indistintamente. Los cuales son sometidos a la posterior segregación de ambos en la progenie, seleccionándose las plantas que contienen el transgén y carecen del GMS. Se basa en el hecho de que las células seleccionadas por poseer el carácter asociado al GMS, usualmente también contienen el gen de interés.

La principal limitante de la co-transformación radica en la alta frecuencia de co-integración de ambos ADN-T (segmento de ADN del plásmido Ti bacteriano transferido al núcleo de la célula vegetal) (Nelson y Cox, 2009) en el mismo locus genómico, lo cual imposibilita su segregación. Debido a esto es necesario obtener muchas líneas transgénicas, para aumentar la probabilidad de que los genes no estén asociados, y varios pasos de cruzamiento. Lo que conlleva a una labor

trabajosa e intensiva para su aplicación. Adicionalmente este método no puede aplicarse en plantas estériles, especies propagadas vegetativamente y no es práctico para cultivos con un largo ciclo de vida como las especies forestales (Matsunaga *et al.*, 2002).

Los elementos transponibles pueden mediar el reposicionamiento del material genético en el genoma de la planta. Por ejemplo, el Ac/Ds de maíz (*Zea mays* L.) ha sido usado para la reubicación y eliminación del gen marcador de selección en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Yoder y Goldsbrough, 1994) y arroz (*Oryza sativa* L.). Estos elementos transponibles pueden ser eliminados del genoma después de la expresión de la transposasa y posteriormente ser reinsertados o no. Basados en esta propiedad, existen dos alternativas: si ocurre una re inserción del transposón, el gen de interés es colocado en el elemento transponible, de manera tal que será reinsertado en un locus diferente al que se encuentra el gen marcador de selección y serán segregados en la descendencia (Cotsaftis *et al.*, 2002). Alternativamente, si no ocurre la re inserción, es ubicado el GMS en el elemento transponible.

La transposición presenta algunas ventajas asociadas a la relocalización del gen de interés, ya que posibilita el estudio cualitativo y cuantitativo del efecto posicional en los niveles de expresión del transgén, solamente con el empleo de una línea transgénica activa transposicionalmente (Cotsaftis *et al.*, 2002). Adicionalmente, permite simplificar los patrones de integración y disminuir el silenciamiento génico. Sin embargo, este sistema posee diversas desventajas, entre las que se incluyen la variabilidad en la eficiencia de transposición en las diferentes especies, largos periodos de tiempo, baja eficiencia de eliminación del gen marcador y la inestabilidad genómica de las plantas transgénicas. La transposición puede inducir rearrreglos genómicos, deleciones, duplicaciones invertidas, inversiones y translocaciones (Yu *et al.*, 2011). Adicionalmente, este sistema es impráctico para plantas con un largo ciclo de vida y tampoco puede ser aplicado en cultivos estériles o propagados vegetativamente.

Otro método desarrollado para eliminar el gen marcador, emplea la maquinaria de reparación del ADN de la célula vegetal. De esta forma, la reparación de la ruptura en la doble cadena de ADN, puede ser mediante recombinación homóloga o por no homología en la unión final de la cadena, lo cual es importante para la supervivencia de todos los organismos (Orel *et al.*, 2003). La proporción

de recombinación homóloga, con respecto a los eventos de no homología en la unión final aumenta si las secuencias homólogas cercanas a la rotura están disponibles (Siebert y Puchta, 2002). Durante el proceso de reparación el GMS puede ser convertido o eliminado (Fishman-Lobell *et al.*, 1992). Orel *et al.* (2003) demostraron que la vía asociada a la delección fue cinco veces más frecuente que la vía de conversión de genes. Estos conocimientos fueron aplicados por varios grupos de investigación en cultivos como *Petunia hybrida* (Galliano *et al.*, 1995) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Muller *et al.*, 1999; Zubko *et al.*, 2000).

Sin embargo la aplicación de la recombinación homóloga tiene grandes desventajas, como la baja eficiencia, delecciones de genes no deseadas y no puede ser controlada, por lo que se pueden perder varios eventos transgénicos durante el proceso de selección. La falta de conocimiento del mecanismo básico de este fenómeno, imposibilita su aplicación en otros cultivos (Puchta, 2003).

En la estrategia de recombinación sitio-específica el gen marcador de selección es flanqueado por los sitios de reconocimiento de una recombinasa en repeticiones directas. Las recombinasas sitio-específicas de origen microbiano poseen la propiedad de hidrolizar el ADN en un segmento determinado y religarlo en una segunda secuencia blanco. Consecuentemente, si se ubica el GMS entre los sitios de reconocimiento de esta enzima, una vez seleccionado el material vegetal transgénico, será posible escindirlo por la actividad de la recombinasa (Darbani *et al.*, 2007).

Los sistemas de recombinación más empleados son el Cre/*lox* del bacteriófago P1 (Hoess *et al.*, 1982; Hoess y Abremski, 1985), FLP/*frt* de *Saccharomyces cerevisiae*, (Cox, 1983; Senecoff *et al.*, 1985) y *R/RS* de *Zygosaccharomyces rouxli* (Araki *et al.*, 1985). Estos sistemas son derivados de la familia de las tirosín-recombinasas, pues poseen un residuo catalítico de tirosina utilizado para atacar el ADN blanco durante el proceso de recombinación (Gidoni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Luego de la reacción un sitio de recombinación (*lox*, *frt* o *RS*) permanece en el genoma y puede ser potencialmente empleado como un segmento para la recombinación integrativa de otros segmentos de ADN.

La recombinación sitio específica se divide en dos categorías fundamentales teniendo en cuenta la posición del gen de la recombinasa. En la primera ambos transgenes y el GMS están en vectores diferentes, por lo que el gen de la recombinasa puede ser introducida en la planta transgénica

mediante retransformación o por cruzamiento sexual (Russel *et al.*, 1992; Hoa *et al.*, 2002; Kerbach *et al.*, 2005). La primera planta transgénica libre de genes marcadores de selección comercialmente viable, se obtuvo por este método, al crear la línea de maíz LY038, donde el gen marcador de selección *nptII*, que se encontraba entre los sitios *lox*, fue eliminado mediante la introducción del gen *cre* por cruzamiento sexual (Ow, 2007). Pero la principal limitación de ambos sistemas es que requieren de tiempo, una labor intensiva durante el paso de mejoramiento, y solo son aplicables a especies con reproducción sexual o donde es posible la retransformación.

Sin embargo, en la segunda categoría de los métodos que emplean la recombinación sitio-específica, el GMS y el gen codificante para la recombinasa (*cre*) están en el mismo vector entre los sitios de recombinación, denominándosele vectores de autoescisión. Estos contienen los genes codificantes para el agente selectivo y la recombinasa, flanqueados por los sitios de reconocimiento de la enzima, y el gen de interés fuera de los sitios de reconocimiento (Verweire *et al.*, 2007). La estrategia de autoescisión es un sistema versátil que puede ser aplicado en cualquier especie y posee flexibilidad en el control espacial y temporal.

Como en los casos anteriores, en los métodos de autoescisión, el gen de la recombinasa no debe ser expresado hasta después de la selección. La expresión de la recombinasa puede ser activada por una señal externa o una señal intrínseca, la cual puede ser aplicada mediante un promotor inducible que controle el gen *cre*. Un ejemplo es el empleo de promotores inducidos por golpe térmico guiando la expresión de la recombinasa.

El gen codificante para la recombinasa también puede estar bajo el control de un promotor inducible químicamente, como es el caso del promotor *GST-II-27* de maíz, el cual es activado por el antídoto del herbicida Safener, mediante el control del sistema *R/RS* en tabaco (Sugita *et al.*, 2000), con la inducción por β -estradiol con el sistema *Cre/lox* en *Arabidopsis* (Zuo *et al.*, 2001), arroz (Sreekala *et al.*, 2005) y tomate (Zhang *et al.*, 2006).

En otros estudios se han empleado promotores inducibles por una señal endógena, formando parte del ciclo de vida de la planta. Por ejemplo, el promotor *NTM19* específico de esporas se ha empleado para dirigir la expresión del gen *cre*, logrando escindir el GMS en tabaco durante la formación de micro-esporas (Mlynárová *et al.*, 2006). Se han obtenido plantas transgénicas de soya

libre de genes marcadores de selección, usando el gen *cre* de la recombinasa bajo el control de un promotor inducible durante la embriogénesis somática (Li *et al.*, 2007). Moravčíková *et al.* (2008) emplearon el promotor *CruC* de *Arabidopsis* inducible en semillas para el control de la expresión del gen *cre* en semillas de tabaco. Con una estrategia similar se obtuvieron plantas de *Brassica napus* libres de genes marcadores de selección mediante un promotor de *Brassica napus* específico de semilla (Kopertekh *et al.*, 2009; Kopertekh *et al.*, 2010).

La estrategia de autoescisión es muy flexible temporalmente, ya que permite que se produzca la escisión en etapas tempranas (embriogénesis somática) o tardías del desarrollo (floración). Adicionalmente, puede ser aplicada a especies de plantas propagadas vegetativamente y con ciclos de vida largos. Además, la escisión del GMS mediada por la recombinasa tiene la ventaja que este puede convertir *loci* de transgenes complejos a menos complejos o la integración de copias simples utilizando el sitio de recombinación remanente (Verweire *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de las estrategias de escisión de GMS, anteriormente descritas, es posible seleccionar la recombinación sitio específico como la más factible a aplicar en *D. purpurea*. Esto se debe, principalmente, a que puede ser utilizado en cualquier tipo de especie y permite activar la escisión en cualquier momento después de seleccionar las plantas transgénicas. Adicionalmente, la eliminación del gen codificante para el agente selectivo, permite emplear el mismo en transformaciones posteriores, introducir otros genes de interés consecutivamente utilizando el sitio de recombinación remanente y simplificar los sistemas de integración complejos (multicopias del transgén).

2.5.4 Escisión del GMS empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox inducido por golpe térmico

Para el desarrollo de un protocolo de escisión del GMS empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox, es necesario tener en cuenta varios factores, como el promotor inducible a emplear. Varias señales (físicas o químicas) pueden activar la recombinación (ver acápite anterior). Sin embargo, la aplicación de promotores inducibles por cambios fisiológicos, es limitada en cultivos poco estudiados como es el caso de *D. purpurea*. Por tanto, la utilización de un promotor

inducible por un estímulo externo como el golpe térmico, es una alternativa funcional para todas las especies, de acuerdo a su sensibilidad al estrés por temperatura.

La auto-escisión inducida por golpe térmico del sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox, ha sido aplicada exitosamente en *Arabidopsis* (Hoff *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2009), maíz (Zhang *et al.*, 2003), tabaco (Liu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005, Luo *et al.*, 2008), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Cuellar *et al.*, 2006), arroz (Akbulak y Srivastava, 2011; Khattri *et al.*, 2011) y banano (*Musa spp*) (Chong-Pérez *et al.*, 2012). La revisión de estos trabajos permite dilucidar otros elementos a seleccionar, como es el tipo de explante y el tiempo que se podría aplicar el golpe de calor, así como la temperatura a la cual es posible activar el promotor bajo las condiciones fijadas. Si se analizan los tipos de explante y tratamientos resumidos en la Tabla I, es posible concluir que el tipo de explante a seleccionar depende del protocolo de transformación del cultivo y de la etapa del mismo en que se aplica la selección. Mientras que los valores de temperatura oscilan entre los 37 y 42°C, durante tiempos de 2-16 h con intervalos de recuperación posteriores o entre ellos. Por lo que es necesario elegir un tiempo de exposición, para seleccionar el tipo de explante y la temperatura a aplicar en un protocolo de auto-escisión inducida por golpe térmico en *D. purpurea*.

Tabla I. Escisión inducida por golpe térmico empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox

Referencia	Planta estudiada	Promotor	Explante/ Tratamiento
Hoff <i>et al.</i> , 2001	<i>Arabidopsis</i>	<i>ArabidopsisHSP81-1</i>	Semillas completas/ 16 h a 37°C
Zhang <i>et al.</i> , 2003	Maíz	Soya <i>HSP17-5E</i>	Callos y embriones inmaduros/ 3-5 h a 42°C
Liu <i>et al.</i> , 2005	Tabaco	<i>ArabidopsisHSP81-1</i>	Plantas/ Dos golpes térmicos de 16 h a 37°C con 32 h a 21°C de recuperación entre ellos
Wang <i>et al.</i> , 2005	Tabaco	Soya <i>HSP17-5E</i>	Semillas y hojas/ Tres golpes térmicos de 2 h a 42°C
Cuellar <i>et al.</i> , 2006	Papa	<i>Drosophilahsp70</i>	Brotos internodales y microtubérculos/ 2-3 h a 42°C
Luo <i>et al.</i> , 2008	Tabaco	<i>Arabidopsis HSP18.2</i>	Plantas/ 8 h a 37°C, 48 h a 25°C y 16 h a 37°C
Akbulak y Srivastava, 2011	Arroz	Soya <i>HSP17-5E</i>	Plantas/ 3 h a 42°C
Khattri <i>et al.</i> , 2011	Arroz	Soya <i>HSP17-5E</i>	Callos, hojas, y semillas/ 4 h a 42°C
Chong-Pérez <i>et al.</i> , 2012	Banano	Soya <i>Gmhsp17.6-L</i> <i>Arabidopsis HSP18.2</i>	Embriones somáticos/ Dos golpes térmicos de 2 h a 42°C con 16 h de intervalo entre ellos

Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Molecular e Ingeniería Metabólica del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) en el período comprendido desde el enero del 2011 hasta abril del 2013.

Procedimientos generales del cultivo *in vitro*

Los instrumentos utilizados para la manipulación aséptica del material vegetal fueron esterilizados en estufa a una temperatura de 180°C durante dos horas antes de cada sesión de trabajo. Dichos instrumentos se mantuvieron en estas condiciones mediante el uso de un esterilizador de bolas de vidrio. Todas las operaciones de disección y transferencias de los explantes se realizaron en cabinas de flujo laminar horizontal o vertical, según corresponda. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave vertical a 121°C y 1,2 Kg./cm² de presión durante 20 min.

Medios de cultivo

Se empleó como medio de cultivo basal la siguiente formulación: sales minerales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con 4,0 mg/L de hidrocloreuro de tiamina, 100 mg/L de mioinositol, 30 g/L de sacarosa y 3,0 g/L de Gelrite[®] (Duchefa, Haarlem, Países bajos) como agente gelificante. El pH fue ajustado a 5,7 con hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 N o ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N antes de la esterilización en autoclave.

Material vegetal

En este trabajo se utilizó como material inicial semillas de *Digitalis purpurea* L. var Rotter Berggold (Farmasaat GmbH, Alemania). Las semillas fueron germinadas y cultivadas *in vitro* en medio de cultivo semisólido siguiendo la metodología descrita por (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

Inducción de callos y regeneración de plantas

La formación de callos fue inducida en medio de cultivo semisólido de formación de callos (medio de cultivo basal con 4,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en lo adelante medio de

cultivo de formación de callos (MFC), a partir de segmentos de hojas de 1,0 cm² de área, obtenidos de plantas cultivadas *in vitro* después del cuarto subcultivo, y colocados en el medio de cultivo semisólido sobre la superficie adaxial (Occeguera 2008). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de oscuridad a una temperatura de 28±2°C durante 28 días. Los callos obtenidos fueron divididos y subcultivados en el mismo MFC.

Para la regeneración los callos fueron fragmentados y transferidos a medio de cultivo basal con 0,5 µM de ácido indolacético (AIA) y 4,4 µM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Los cultivos fueron incubados en cámara de crecimiento con luz natural y temperatura controlada de 27±2°C (Occeguera 2008). Se realizaron subcultivos cada 15 días durante 45 días en frascos con 70 mL de medio de cultivo semisólido de multiplicación de brotes (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

3.1. Selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de *Digitalis purpurea*

Para la selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de *D. purpurea*, se utilizaron fragmentos de hojas de aproximadamente 1 cm², procedentes de plantas *in vitro*. La solución del antibiótico (Duchefa, Haarlem, Países bajos) se preparó a 50 mg/mL, se esterilizó por filtración y se adicionó al MFC luego de la esterilización, cuando la temperatura del medio de cultivo estaba entre 40-45°C. Se realizaron seis tratamientos con 35 explantes cada uno, en los cuales se utilizaron las siguientes concentraciones de higromicina B: 0 (Control), 3 (Tratamiento 1), 6 (Tratamiento 2), 9 (Tratamiento 3), 12 (Tratamiento 4) y 15 mg/L (Tratamiento 5). Se colocaron cuatro explantes en cada frasco de vidrio de 250 mL de capacidad, con 30 mL de medio de cultivo. Los explantes fueron subcultivados cada dos semanas. A las cuatro semanas se evaluó el porcentaje de callos formados por área del explante.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA versión 8 para Sistema operativo *Windows*. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias *a posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza. Las variables fueron correlacionadas empleando la R de Spearman.

3.2. Selección de la temperatura y tipo de explante para la eliminación inducida por golpe térmico del gen marcador de selección

3.2.1 Efecto del golpe térmico en hojas de *Digitalis purpurea*

Para el análisis del efecto de la temperatura en la regeneración de hojas de *D. purpurea*, se emplearon segmentos foliares de 1,0 cm² de área de plantas cultivadas *in vitro*. Se diseñaron cinco tratamientos con 35 explantes cada uno: un Control (25°C) no sometido a estrés por temperatura y los restantes mantenidos a las temperaturas 37, 40, 42 y 45±0,1°C en baño termostatado (Lauda RE104, Alemania), respectivamente. Los discos foliares fueron transferidos a tubos de 50 mL con 15 mL de MFC líquido. El golpe térmico se realizó dos veces, durante dos horas con 16 h de intervalo en MFC líquido a temperatura ambiente (25°C), y se colocaron en medio de cultivo semisólido de MFC durante 28 días, sobre la superficie adaxial (Occeguera, 2008). Luego de transcurrido este tiempo se evaluó el porcentaje de callos formados por área del explante y el número de callos formados por explante y se subcultivaron en iguales condiciones durante cuatro semanas. Posteriormente los callos fueron fragmentados y transferidos a medio de cultivo semisólido para la regeneración de plantas, con periodos de subcultivo de 15 días. A los 45 días se determinó el número de plantas regeneradas por callo.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA versión 8 para Sistema operativo *Windows*. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias *a posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza. Se correlacionaron las variables grado de formación y número de callos por explante, con respecto a la temperatura, empleando la R de Spearman.

3.2.2 Efecto del golpe térmico en callos de *Digitalis purpurea*

Para el análisis del efecto de la temperatura en la regeneración de callos de *D. purpurea*, se tomaron segmentos foliares de 1,0 cm² de área y se colocaron en medio de cultivo semisólido de formación de callos, sobre la superficie adaxial. Los callos obtenidos fueron fragmentados hasta alcanzar 0.3 ± 0.1 g de masa fresca, se transfirieron a tubos de 50 mL con 15 mL de MFC líquido y se sometieron a golpe térmico a las temperaturas 37, 40, 42 y 45°C±0,1°C en baño termostatado

(Lauda RE104, Alemania), durante dos horas dos veces con 16 h de intervalo entre ellos, en las cuales todos los tratamientos se mantuvieron en MFC líquido a temperatura ambiente (25°C) e inclinados para aumentar el intercambio gaseoso. Adicionalmente se mantuvo un Control (25°C) no sometido a estrés por temperatura, mas si mantenido en medio líquido durante el mismo tiempo. Para todos los tratamientos se emplearon 35 callos. Se transfirieron a MFC durante 28 días y luego de transcurrido este tiempo, se evaluó la masa fresca de los callos. Posteriormente fueron fragmentados y transferidos a medio de cultivo semisólido para la regeneración de plantas, con periodos de subcultivo de 15 días. A los 45 días se determinó el número de plantas regeneradas por callo.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA versión 8 para Sistema operativo *Windows*. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias *a posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza. Las variables masa fresca de los callos luego de 28 días en MFC y temperatura fueron correlacionadas empleando la R de Spearman.

3.3. Obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* libres de marcador de selección

Cepas bacterianas y plásmidos empleados

Se empleó la cepa de *A. tumefaciens* C58C1Rf^R, con el plásmido auxiliar pMP90 (Koncz y Schell 1986). Se introdujeron indistintamente los plásmidos pTJK136 (Kapila *et al.*, 1997), pCAMBIA1301 (CAMBIA, Camberra, Australia) y pAthsp-A (Chong-Pérez *et al.*, 2012) como vectores de transformación.

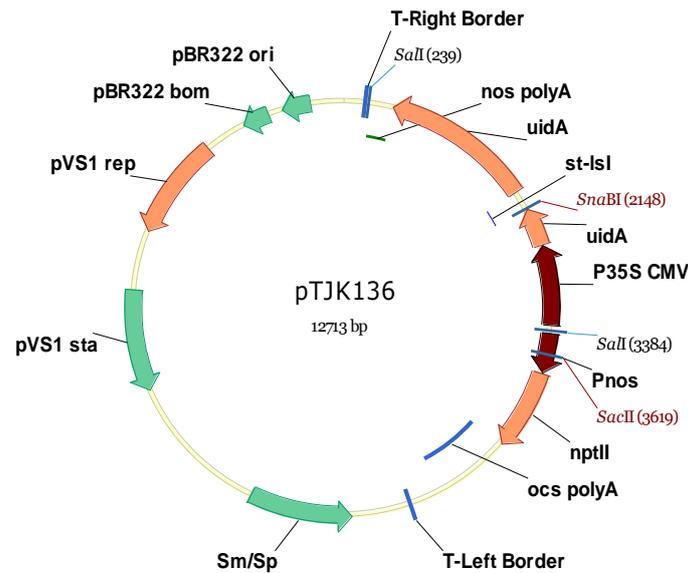


Figura 3. Vector de transformación pTJK136. *nptII*: gen de la neomicina fosfotransferasa II; Pnos: promotor de la nopalina sintetasa; ocs polyA: terminador y señales de poliadenilación del gen de la octopina sintetasa. *uidA*: gen codificante para la β -glucuronidasa de *E. coli*; P35S CMV: promotor del virus del mosaico de la coliflor; nos polyA: terminador y señales de poliadenilación de la nopalina sintetasa; *st-lsI*: intrón *st-ls1* (*Solanum tuberosum* L.).

El vector binario pTJK136 (Figura 3) contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) (EC 2.7.1.95) bajo el control del promotor de la nopalina sintetasa (*nos*) y el terminador y las señales de poliadenilación de la octopina sintetasa. Además, la construcción incluye al gen de la β -glucuronidasa de *Escherichia coli* (*uidA*) (Jefferson *et al.*, 1987) con el intrón *st-ls1* de la papa (*Solanum tuberosum* L.). El gen *uidA* se encuentra bajo el control del promotor de la región 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el terminador y las señales de poliadenilación del gen *nos* (nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*).

El plásmido pCAMBIA1301 (Figura 4) posee resistencia a kanamicina, contiene el gen *hpt* codificante para la higromicina fosfotransferasa (E.C 2.7.1.119) bajo el control del promotor y terminador CaMV 35S. Adicionalmente posee el gen *uidA* con igual promotor y el terminador de la nopalina sintetasa.

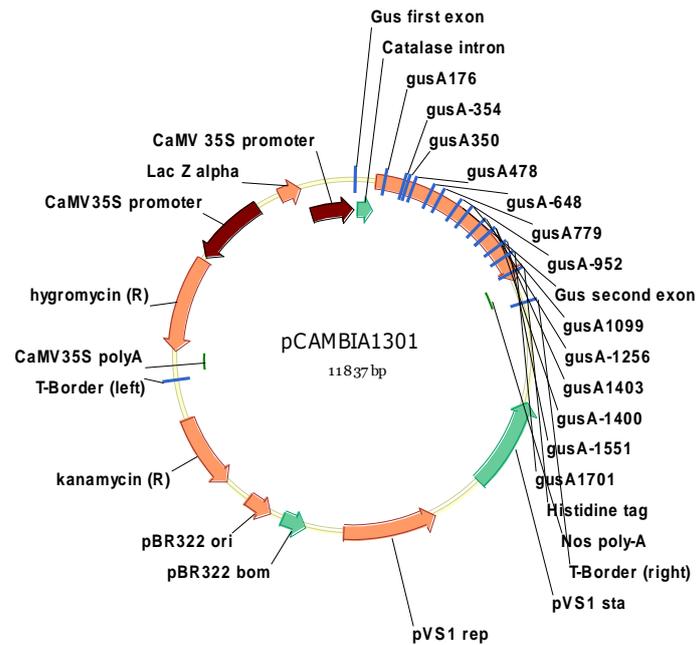


Figura 4. Vector de transformación pCAMBIA 1301. *hpt*: gen de la higromicina fosfotransferasa; Gus: gen reportero *uidA* que codifica para la β-glucuronidasa de *E. coli*; CaMV 35S: promotor del virus del mosaico de la coliflor; nos: terminador y señales de poliadenilación de la nopalina sintetasa; gusint: intrón *caster bean catalase*. LB y RB: bordes izquierdo y derecho, respectivamente, del ADN-T.

El ADN-T del vector pAthsp-A (Figura 5) posee tres unidades transcripcionales entre los sitios *lox*. La primera contiene el gen marcador de selección *hpt*, bajo el control del promotor y el terminador de la nopalina sintetasa. La segunda unidad incluye el gen *cre*-intrón, codificante para una recombinasa sitio-específica Cre, subordinado al promotor inducible por golpe térmico HSP18.2 de *Arabidopsis thaliana*. La tercera unidad contiene el casete de expresión del gen codificante (*codA*) para la citosina desaminasa, ubicado bajo el control del promotor CaMV 35S. Fuera del fragmento de escisión se encuentra el gen *nptII*, entre el promotor (*Pnos*) y terminador (*Tnos*) de la nopalina sintetasa, como gen de interés (GOI, del inglés *gene of interest*). El ADN-T no recombinado se denomina “HCCN” (conteniendo los cuatro genes antes mencionados), mientras que el recombinado es referido como “N” (pues solo mantiene el gen *nptII*).

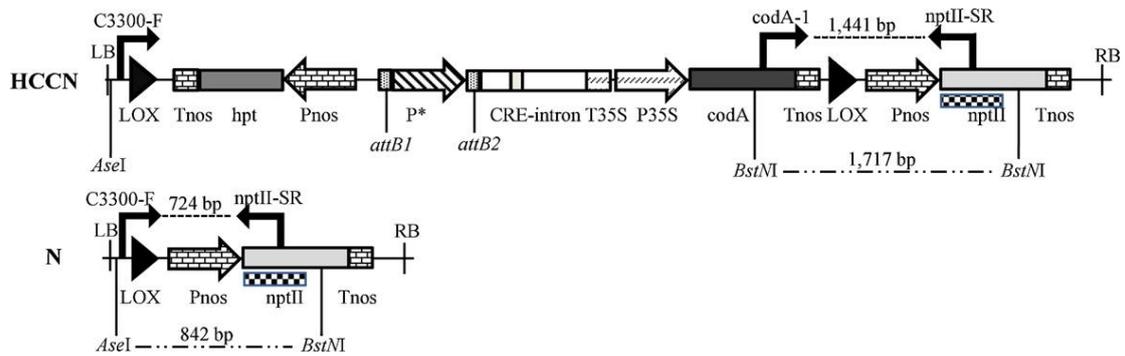


Figura 5. Representación esquemática del ADN-T del vector de transformación pAthsp-A (HCCN) y el producto de su escisión inducida por golpe térmico (N). P*: Promotor inducible por golpe térmico HSP18.2 de *Arabidopsis thaliana*; LB y RB: bordes izquierdo y derecho del ADN-T; *lox*: sitios de reconocimiento de la recombinasa; Tnos: señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa; *hpt*: gen codificante para la higromicina fosfotransferasa; Pnos: promotor del gen de la nopalina sintetasa; *codA*: gen que codifica para la citosina desaminasa; *nptII*: gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa; T35S: señal de poliadenilación del CaMV 35S; *cre*-intrón: gen *cre* codificante para la recombinasa con un intrón; P35S: promotor CaMV 35S. Se indican los cebadores empleados para el análisis por PCR (Chong-Pérez *et al.*, 2012).

Transformación de *A. tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* C58C1Rif^R (pMP90) fue transformada con los vectores de transformación pTJK136, pCAMBIA1301 y pAthsp-A. La transformación se realizó a partir de células competentes preparadas según la metodología propuesta por Hofgen y Willmitzer en 1988. A 500 µL de cultivo de células competentes se añadieron 100 µL de agua y 10 µL del plásmido (1 µg). Luego de homogenizar con cuidado se sometió la mezcla a la siguiente secuencia de choques térmicos: 5 min en hielo, 5 min en nitrógeno líquido (N₂) y 5 min a 37°C. Este procedimiento se realizó por duplicado.

El cultivo se dejó enfriar durante 10 min en hielo, se le añadió 1 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro de sodio (NaCl)) y se incubó a 28°C por 4 h. Posteriormente, de 100 a 600 µL del cultivo se inocularon en placas con medio de cultivo semisólido LB con los antibióticos adecuados. Se incubaron a 28°C toda la noche

y se seleccionaron colonias aisladas al azar para chequear la transformación mediante el aislamiento de ADN plasmídico y la digestión con enzimas de restricción.

Infección y Co-cultivo

Antes de la transformación, se aisló una colonia de cada cepa de *A. tumefaciens* crecida en medio de cultivo semisólido LB con: rifampicina 50 mg/L, 100 mg/L de espectinomicina y 300 g/L estreptomicina en el caso del plasmidio pTJK136 y 50 mg/L de rifampicina y kanamicina en el caso de los vectores pCAMBIA1301 y pAthsp-A. Cada colonia se inoculó en 3 mL de medio de cultivo LB líquido con los mismos antibióticos (precultivo). Los precultivos se incubaron por 24 h a 28°C. Posteriormente se inocularon 100 µL del precultivo crecido por separado en 50 mL de medio de cultivo líquido YEP (10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de bactopectona, 5 g/L de NaCl, pH 7,0) con el mismo suplemento de antibióticos (exceptuando la rifampicina) y se mantuvieron toda la noche en agitador orbital (Retomed) a 150 rpm. Después de 16 h, las células fueron colectadas por centrifugación a 3000 g a 4 °C por 10 min y el precipitado fue resuspendido en medio de cultivo de infección (sales MS al 100%, 2% de sacarosa (m/v), 1,98 g/L de D(+)-glucosa, 3,9 g/L de ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico (MES), 200 µM de acetosiringona, pH 5,5) hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,7.

Los segmentos de hojas fueron sumergidos en la suspensión de *Agrobacterium* por 15 min con agitación manual cada dos o tres minutos y posteriormente se secaron por contacto con papel de filtro (Waltman®). Se transfirieron a placas de Petri de 9 mm con medio de co-cultivo (MFC con 200 µM de acetosiringona, pH 6,3 antes de la esterilización por autoclave). Todas las placas fueron selladas con Parafilm® y colocadas en la oscuridad por 5 días a 21°C.

Observación histoquímica del producto de expresión de β-glucuronidasa

A partir del ensayo histoquímico GUS (Jefferson *et al.*, 1987) se observó la expresión transitoria de la β- glucuronidasa en los fragmentos de hojas transformados con los vectores binarios pTJK136 y pC1301, a los 5 días de la infección, así como la expresión estable de esta enzima en callos y plantas regeneradas. Los tejidos analizados fueron incubados a 37°C en una solución tampón que

contenía 1 mM de la sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (sustrato de la enzima; comercialmente X-Gluc, Duchefa, Haarlem, Países bajos), 100 mM de Na_3PO_4 (pH 7,0), 0,5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_4$ y 0,1 % (v/v) de Tritón X-100. Simultáneamente se sometieron al mismo tratamiento explantes no transformados que fueron usados como control negativo.

Posterior a la incubación todas las muestras fueron sumergidas en etanol al 70 % (v/v) durante 2 h para eliminar las clorofilas y otros pigmentos foliares. El análisis del ensayo fue realizado por evaluación visual y fotográfica al estereoscopio óptico (Motic). La expresión transitoria y estable se determinó de forma cualitativa, clasificándose como positiva si se observaba alguna porción del tejido teñido de azul.

3.3.1 Selección y regeneración de plantas transformadas de *D. purpurea*

Los explantes co-cultivados fueron lavados en MFC líquido con 200 mg/L de timentina y secados por contacto con papel de filtro. Posteriormente fueron transferidos a MFC semisólido con 200 mg/L de timentina y los siguientes agentes selectivos: para el caso de los discos foliares transformados con el vector binario pTJK136 se adicionó al medio de cultivo geneticina 70 mg/L, los explantes en contacto con el pCAMBIA1301 se mantuvieron a la concentración de higromicina seleccionada en el acápite III.1 y para el caso del plásmido pAthsp-A se emplearon ambos agentes selectivos indistintamente. Adicionalmente se utilizaron como controles discos foliares no transformados en MPC sin antibiótico y con cada uno de los antibióticos empleados para la selección. Se mantuvieron en medio selectivo durante ocho semanas con subcultivos cada 15 días. Los callos obtenidos se sometieron a golpe térmico a las temperaturas seleccionadas, como se describe en el acápite 3.2.2 y mantenidos dos semanas más en las mismas condiciones. Posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo semisólido de regeneración, con subcultivos cada 15 días.

3.3.2 Análisis mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las líneas de plantas regeneradas

Extracción de ADN genómico vegetal

Para la extracción del ADN total de plantas de *Digitalis purpurea*, se empleó el protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004) con ligeras modificaciones, como se describe a continuación. Se tomó entre 0.2-0.5 g de tejido vegetal de plantas cultivadas *in vitro* y se maceró con nitrógeno líquido en tubos eppendorf (2.0 mL) hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 2 mL de buffer de extracción [4% (m/v) CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio), 10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético), 2% (m/v) PVP 10,000, 10 mM mercaptoetanol] y se homogenizó empleando el vórtex durante unos segundos. Las muestras fueron incubadas a 55°C durante 30 min y posteriormente centrifugadas a 5000 rpm y 4°C, durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se le adicionó RNAsa (200 g/L de concentración final) por 15 min a 37°C. El extracto se mezcló con igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó en iguales condiciones. Se transfirió la fase acuosa a tubos limpios y se adicionaron 2 mL de 2-isopropanol helado. Las muestras se mantuvieron una hora a -20°C y posteriormente se centrifugaron a 11000 rpm y 4°C, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 500 µL de etanol 70% (v/v), se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y se dejó secar. El precipitado fue resuspendido en 50 µL de agua.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La escisión de los genes marcadores de selección y de la recombinasa en las plantas regeneradas fue comprobada por PCR a partir de ADN genómico extraído de las mismas, empleando dos combinaciones de tres cebadores (I/II; II/III). Como control positivo de las reacciones de PCR se utilizó ADN plasmídico extraído a partir de la cepa DH5α-pAthsp-A de *E coli*. La secuencia de los tres cebadores se lista a continuación:

C-3300-F: 5'-GCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACG-3';

nptII-SR: 5'-CCGCATTGCATCAGCCATGATGG-3';

codA-1: 5'-GTCGCCAACCCGCTGGTCAATATTC-3'.

La amplificación fue realizada en un volumen de reacción final de 20 µL, que contenía 1 µL de ADN genómico a 50 ng/µL, 0,4 µM de cada cebador, 200 µM de cada desoxirribonucleótido, tampón de reacción de la enzima DreamTaq polimerasa 1X y 1 unidad de esta enzima (TaKaRa, Japón). Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en el equipo de control térmico programable Mastercycler (Eppendorf, Alemania).

La secuencia de reacciones para la amplificación con los cebadores C-3300-F y *nptII*-SR comenzó con 1 min de desnaturalización a 95°C, seguida por 30 ciclos del bloque siguiente: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 8 min. Luego se realizó un paso final de extensión a 72°C por 15 min. Para la amplificación *nptII*-SR y *codA-1* se siguió una secuencia similar a la de anteriormente descrita, pero con las siguientes modificaciones en el bloque de 35 ciclos: 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 90 s.

Los fragmentos amplificados fueron analizados visualmente por electroforesis a 100 V por 40 min en gel de agarosa al 0.8 % (m/v) y tampón Tris-Borato-EDTA (TBE, Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8), seguida de tinción con solución 5 µg/mL de bromuro de etidio y transiluminación con luz ultravioleta (UV).

Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. Selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de *Digitalis purpurea*

La concentración mínima inhibitoria de geneticina durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea* (50 mg/L) fue determinada por Chong-Pérez *et al.* (2008) y aplicada en un protocolo de transformación de esta especie (Izquierdo, 2010). Sin embargo, fue posible obtener plantas que no contenían ninguno de los genes transferidos vía *A. tumefaciens*, por lo que constituían escapes del proceso de selección. Teniendo en cuenta estos resultados, se trazaron dos estrategias para perfeccionar el proceso de selección en esta especie. Se aumentó la concentración de G418 a 70 mg/L y se seleccionó la concentración mínima letal de higromicina B en las mismas condiciones, para el empleo alternativo del gen *hpt* como marcador de selección.

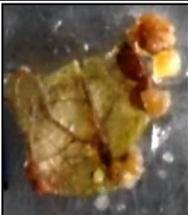
Para la selección de la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de formación de callos de *D. purpurea*, se evaluó el efecto de las concentraciones de 3-15 mg/L de este antibiótico adicionado al medio de cultivo semisólido de formación de callos (MFC). Luego de transcurridos 28 días de cultivo de los discos foliares en las condiciones antes descritas, se determinó el área del explante en la cual hubo formación de callos, aplicando la escala descriptiva presentada en la Tabla II. De esta forma se distribuyeron rangos del 0-4, desde la no formación de callos en el explante (grado 0), hasta el 100% de la superficie del explante con proliferación de los mismos (grado 4). Esta escala descriptiva fue elaborada para este trabajo, por lo que este constituye el primer informe de su empleo.

Los cinco tratamientos diseñados permitieron evaluar el efecto (formación de callos) de las concentraciones de 3, 6, 9, 12 y 15 mg/L de higromicina B, en contraste con un tratamiento control que no contenía antibiótico en su medio de cultivo.

En la totalidad de los explantes incluidos en el control se produjo formación de callos en más de un 75% del área del disco foliar (Figura 6). A diferencia de los restantes tratamientos (1-4), en los cuales se evidenció una disminución de los grados medios (asociados a la formación de callos por

área del explante) según la escala descriptiva, hasta que no se obtuvieron callos. Existe una correlación negativa (R de Spearman -0.86, $p < 0.01$) entre el grado de formación de callos por explante y las concentraciones de higromicina, en el rango evaluado (0-15 mg/L). Este resultado se debe a aumentos de la toxicidad del antibiótico proporcionales a su concentración, que conllevan a la muerte gradual de las células vegetales, hasta alcanzar valores que ocasionan la mortalidad de todo el tejido (Tratamientos 4 y 5). Este comportamiento es similar al descrito en la determinación de la concentración mínima inhibitoria de geneticina en el procesos de formación de callos de esta especie, en el cual se acrecentó el grado de afectación de los explantes con el aumento de las concentraciones de antibiótico evaluadas, hasta alcanzar un 100% de inhibición de los mismos (Chong-Pérez *et al.*, 2008).

Tabla II. Escala descriptiva empleada para evaluar el efecto de concentraciones variables de higromicina B, sobre discos foliares de *Digitalis purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos.

Área del explante en la cual se observó formación de callos (A %)				
A=0 (Grado 0)	A≤25 (Grado 1)	25>A≤50 (Grado 2)	50>A≤75 (Grado 3)	A>75 (Grado 4)
				

La concentración mínima letal es la menor concentración a la cual es posible alcanzar un 100% de mortalidad. Si aplicamos este concepto a estos resultados es necesario seleccionar el tratamiento a partir del cual no se obtienen callos, lo cual aseguraría que, cuando se aplique en un sistema de selección, se eviten los escapes de plantas no transformadas. Por tanto, la concentración mínima letal de los discos foliares de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos es de 12 mg/L.

El gen codificante para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (*nptII*) fue el primer gen empleado como marcador de selección en plantas. Su producto de expresión confiere resistencia a los antibióticos kanamicina, geneticina y neomicina. Desde entonces es el sistema de selección más comúnmente aplicado para generar plantas transgénicas con propósitos científicos (Miki y McHugh, 2004). Diversos estudios han sido desarrollados con el objetivo de dilucidar los efectos predecibles e inesperados del empleo de GMS, mas en el caso del *nptII* los resultados son favorables. El producto de este gen no es una toxina o alérgeno para animales o humanos, ni su uso en plantas transgénicas compromete el empleo de antibióticos en estos organismos. Adicionalmente, es poco probable que se transfiera del genoma de las plantas a otros microorganismos por transferencia génica horizontal, es altamente sensible a hidrólisis enzimática y no genera efectos pleiotrópicos (Ramessar *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2009).

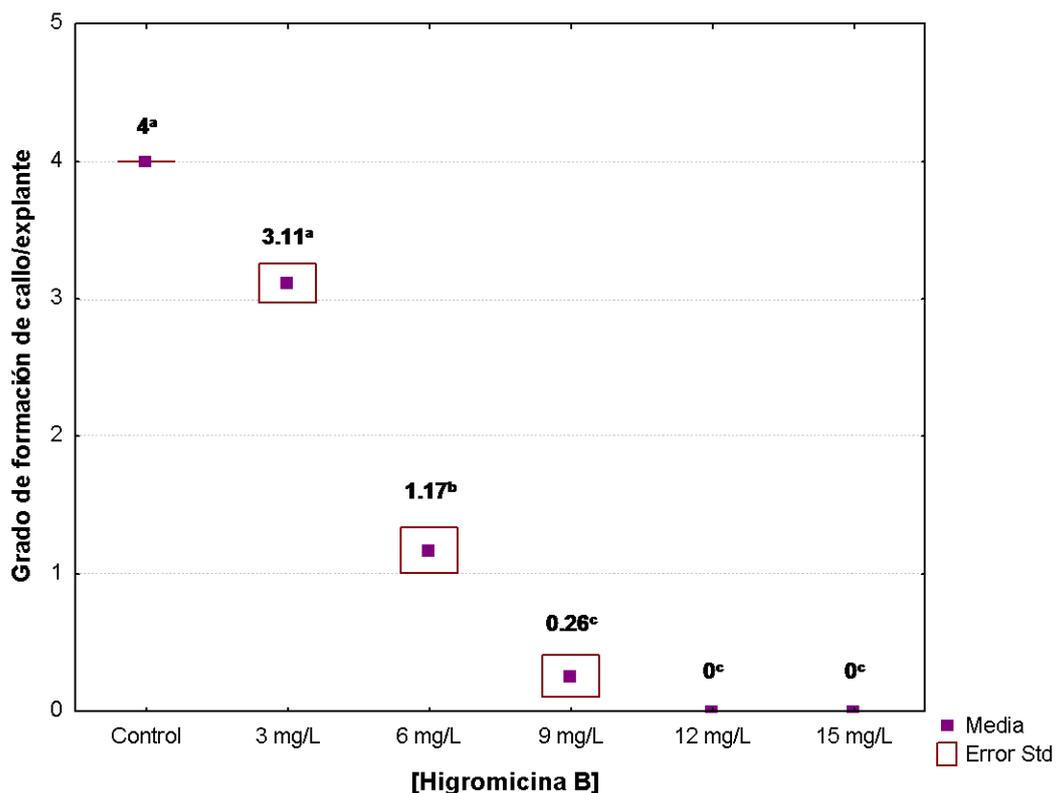


Figura 6. Efecto de concentraciones variables de higromicina B, sobre discos foliares de *Digitalis purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos con respecto a un Control sin antibiótico. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

La higromicina B es el segundo antibiótico de uso más frecuente en el proceso de selección de eventos transgénicos, debido en parte a su alta toxicidad para las plantas. El gen de *E. coli aphIV* (*hpt*) codifica para la enzima higromicina B fosfotransferasa, confiriendo resistencia a este antibiótico en bacterias, hongos, células vegetales y animales. Es usual su empleo como GMS cuando el gen *nptII* no ha sido efectivo. En un análisis de una muestra de publicaciones durante el 2002, este gen fue utilizado en el 19-31% de las plantas transgénicas obtenidas con fines investigativos (Miki y McHugh, 2004). Por ejemplo, su aplicación en cotiledones de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) generó un efecto tóxico de 20 y 30 veces superior a la kanamicina y la neomicina, respectivamente (Joersbo y Okkels, 1996).

Si comparamos las concentraciones seleccionadas de geneticina e higromicina B, para su empleo en un sistema de selección en el proceso de formación de callos de *D. purpurea*, la cantidad necesaria del segundo antibiótico es considerablemente inferior (5,8 veces). Por lo que su empleo reduciría notablemente los costos asociados al uso de estos agentes (G418 49.17 Euro/g higromicina B 115.72 Euro/g). Además se tiene otro agente selectivo para, en el caso que lo amerite, retransformar plantas que ya contengan uno de estos GMS.

La estructura, función y efectos de los antibióticos aminoglucosídicos en plantas cultivadas *in vitro* y protocolos de transformación, ha sido revisado por Padilla y Burgos (2010). De acuerdo con lo planteado en este artículo, existen diversos factores a tener en cuenta para elaborar un sistema de selección efectivo con antibióticos de naturaleza aminoglucosídica. Por lo que es necesario analizar el modo de acción del agente selectivo en células vegetales cultivadas *in vitro*, la complejidad del explante sometido a selección y las características del protocolo de transformación. La susceptibilidad de las plantas a higromicina B y geneticina es variable para las diversas especies, genotipos y tejidos. Las diferencias en la sensibilidad a un mismo antibiótico en cotiledones, hipocótilos, discos foliares y callos, son perceptibles si se tiene en cuenta las conmutaciones en su naturaleza química. Así es que, mientras mayor y más compleja sea la estructura de un explante, más difícil será determinar la fitotoxicidad de estos compuestos, ya que existirán mecanismos que prevengan la llegada de los mismos a la célula. Teniendo en cuenta estos aspectos, es

aconsejable aplicar el agente selectivo inmediatamente después del proceso de transformación (para evitar la proliferación de células no transformadas) y antes de la regeneración de plantas, en las cuales las concentraciones necesarias para alcanzar dosis inhibitorias son altas, dada la complejidad del explante. Puede ser aconsejable establecer estos parámetros para cada medio de cultivo del protocolo, lo cual evitaría los comunes escapes y formaciones de quimeras referenciados en múltiples trabajos de transformación. Adicionalmente, se ha sugerido que el agotamiento del antibiótico en la vecindad de las células transgénicas, permite la proliferación de células no transformadas y la obtención de brotes debido a la detoxificación de células adyacentes. Por lo que, en la mayoría de los sistemas de transformación, es predecible la obtención de un número de escapes y quimeras, a pesar del correcto diseño del proceso de selección (Padilla y Burgos, 2010).

4.2. Selección de la temperatura y tipo de explante para la eliminación inducida por golpe térmico del gen marcador de selección

Para desarrollar una metodología de escisión del marcador de selección se deben tener en cuenta diversos aspectos asociados a la estrategia a emplear y sus características. La aplicación de un sistema de recombinación sitio-específico como el *Cre/lox* posee diversas ventajas (ver acápite 2.5.3), mas las fundamentales se basan en que puede ser utilizado en cualquier tipo de especie y en la posibilidad de activar la escisión en cualquier momento después de seleccionar las plantas transgénicas. Estas prerrogativas señalan a la autoescisión como la estrategia idónea a emplear en plantas de *D. purpurea*.

Sin embargo, para su implementación es necesario establecer las condiciones a las cuales se produce la activación de la recombinación, de acuerdo a la señal seleccionada para producir este efecto. La inducción de la expresión del gen *cre* por golpe térmico ha sido frecuentemente empleada y revisada (ver acápite 2.5.4). Por lo que es posible concluir que, para su puesta en práctica, es imprescindible conocer el tipo de explante, la temperatura y tiempo de exposición, a los cuales se va a aplicar. Estas variables pueden comportarse de manera diferente en las diversas

especies vegetales, por lo que son necesarios estudios previos y toma de decisiones que simplifiquen los múltiples factores a fijar para su ejecución.

De acuerdo con los protocolos de regeneración (Occeguera, 2008) y transformación de *D. purpurea* (Izquierdo, 2010), existen dos tipos de explantes factibles para la aplicación del golpe térmico: discos foliares y callos.

Para el género *Digitalis*, no se han publicado, hasta el momento, investigaciones relacionadas con el efecto de un golpe térmico en plantas cultivadas *in vitro*, por lo que se desconoce la sensibilidad de esta especie ante este factor abiótico. Además, los valores referenciados en diversas publicaciones oscilan entre los 37 y 42°C en dependencia del tratamiento, rango en el cual es necesario determinar el efecto del estrés por temperatura para el caso particular de *D. purpurea*, en un tiempo dado de exposición a las mismas.

Teniendo en cuenta estos factores se designó el tiempo de aplicación empleado por Chong-Pérez *et al.* (2012) en bananos: dos horas de golpe térmico, dos veces, con intervalo de 16 h entre ellos. Fijando este parámetro se evaluó el efecto de las temperaturas 37, 40, 42 y 45°C en hojas y callos de *D. purpurea*, en comparación con un control no sometido a golpe térmico.

4.2.1 Efecto del golpe térmico en hojas de *Digitalis purpurea*

Para la evaluación del efecto del golpe térmico en hojas de *D. purpurea*, se transfirieron segmentos de discos foliares a medio de cultivo líquido de formación de callos. Se mantuvieron en baño termostático durante el tiempo seleccionado para desarrollar el golpe de calor. Paralelamente, se conservaron igual cantidad de segmentos foliares en este medio de cultivo líquido sin aplicarle estrés por temperatura (Control, mantenido a temperatura ambiente de 25°C). Posteriormente se transfirieron a medio de cultivo semisólido de formación de callos durante 28 días. Luego de transcurrido este tiempo se evaluó la formación de callos por hoja empleando dos parámetros: grado de formación, utilizando la misma escala propuesta en la Tabla II, y número de callos.

Al comparar las medias del grado de formación de callo por explante de cada uno de los tratamientos (Figura 7), es posible apreciar que, a medida que aumenta la temperatura, disminuye

el área del explante en la que se obtienen callos, hasta el tratamiento mantenido a 45°C, en el cual no se produjo formación de callos en ninguno de estos. Sin embargo, no existen diferencias significativas para los discos foliares estresados a las temperaturas de 37 y 40°C, con respecto al control no sometido a golpe térmico.

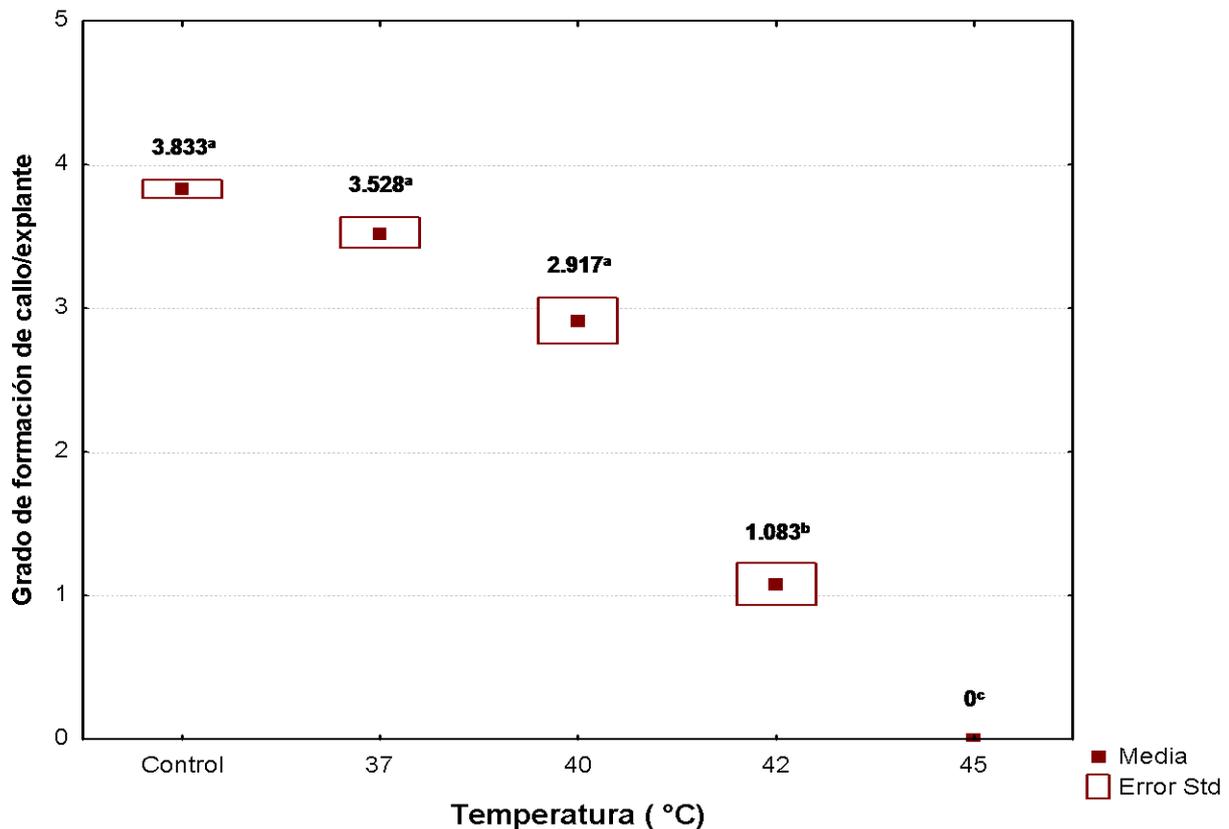


Figura 7. Efecto del golpe térmico a 37, 40, 42 y 45°C en el grado de formación de callos en discos foliares de *Digitalis purpurea*, en comparación con un control mantenido a 25°C. El golpe térmico fue aplicado a los discos foliares durante dos horas, dos veces, con intervalo de 16 h entre ellos. Luego los explantes fueron transferidos a medio de cultivo semisólido de formación de callos por 28 días. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

Al comparar los resultados anteriormente descritos con la determinación del número de callos obtenidos por explante, como parámetro evaluativo más sensible del mismo proceso de formación de callos (Figura 8), es posible diferenciar de manera significativa al tratamiento control de los restantes. Adicionalmente, para esta variable, no fue posible detectar diferencias entre los

tratamientos sometidos a 37, 40 y 42°C y tampoco se produjo formación de callos en los discos foliares golpeados a 45°C.

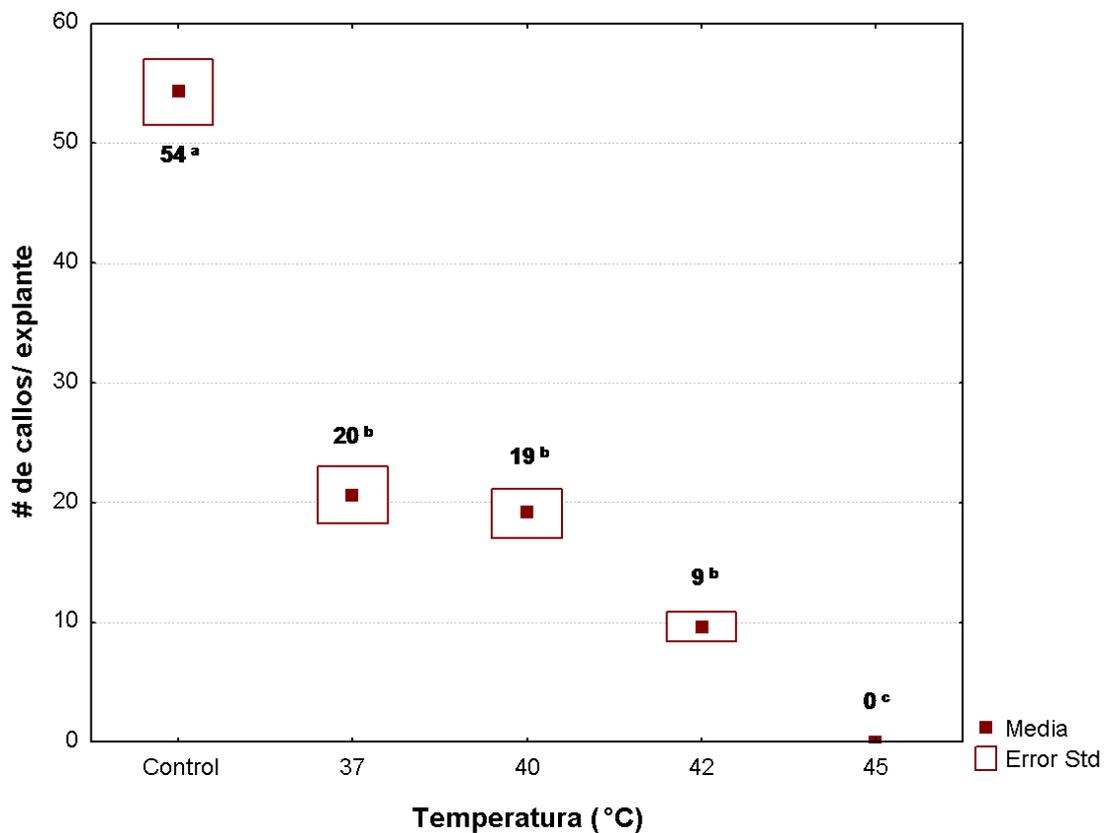


Figura 8. Efecto del golpe térmico a 37, 40, 42 y 45°C en el número de callos en discos foliares de *Digitalis purpurea*, en comparación con un control mantenido a 25°C. El golpe térmico fue aplicado a los discos foliares durante dos horas, dos veces, con intervalo de 16 h entre ellos. Luego los explantes fueron transferidos a medio de cultivo semisólido de formación de callos por 28 días. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

Fue posible comprobar que la temperatura afecta significativamente el grado de formación y número de callos por explante, al determinar que existe una correlación negativa para estos parámetros (R de Spearman -0.86 y -0.83, respectivamente, para $p < 0.01$).

Varias inferencias pueden ser realizadas a partir de esos resultados, bajo las condiciones propuestas. El aumento de la temperatura a la cual se realiza el golpe térmico, puede ocasionar daño celular en los discos foliares y, por tanto, afectar el proceso de inducción y la formación de

callos. Mas este efecto es considerable a temperaturas superiores de 40°C y hasta 45°C. Lógicamente la formación y proliferación de callos, bajo las mismas condiciones fisiológicas, es proporcional a la regeneración de plantas. Por lo que es posible predecir que la mayor temperatura a la cual pueden ser alcanzados resultados similares al control en este parámetro es a 40°C. Continuando este análisis, es permisible afirmar que si se aplica este estrés sobre discos foliares a temperaturas iguales o superiores a 45°C, durante el tiempo anteriormente descrito, no es posible regenerar plantas.

Los callos formados en los discos foliares sometidos a golpe térmico, fueron mantenidos 28 días en MFC para su proliferación. Posteriormente se trasladaron a medio de cultivo semisólido de regeneración con periodos de subcultivo de 15 días. A los 45 días se determinó el número de plantas regeneradas por explante.

La mayor temperatura empleada para realizar el golpe de calor, a la cual no fue posible encontrar diferencias significativas, con respecto al control, fue 40°C (Figura 9). Este resultado se corresponde con lo esperado, si se tiene en cuenta el comportamiento de los explantes en estudio, durante la fase de formación y proliferación de callos. De igual manera no fue posible obtener plantas en el tratamiento sometido a 45°C. Por lo que se recomienda seleccionar la temperatura de 40°C, si se desea realizar un golpe térmico en discos foliares de *D. purpurea*, bajo las condiciones establecidas, sin que se afecte la regeneración de plantas, para su empleo en una metodología de escisión de GMS. Sin embargo, es necesario conocer si es posible activar el promotor inducible por golpe térmico bajo estas condiciones.

Los discos foliares son el material de partida para el proceso de regeneración y transformación de la especie en estudio. Según el protocolo descrito por Izquierdo (2010), la formación de callos en medio selectivo durante ocho semanas y la posterior regeneración en medio no selectivo permite la obtención de plantas transgénicas en no menos de cuatro meses. La estrategia planteada, permitiría seleccionar las plantas transgénicas con el fenotipo deseado e inducir a partir de sus discos foliares la escisión de la secuencia no deseada. Sin embargo, esta estrategia dilataría el

tiempo necesario para desarrollar exitosamente la metodología de eliminación del marcador de selección.

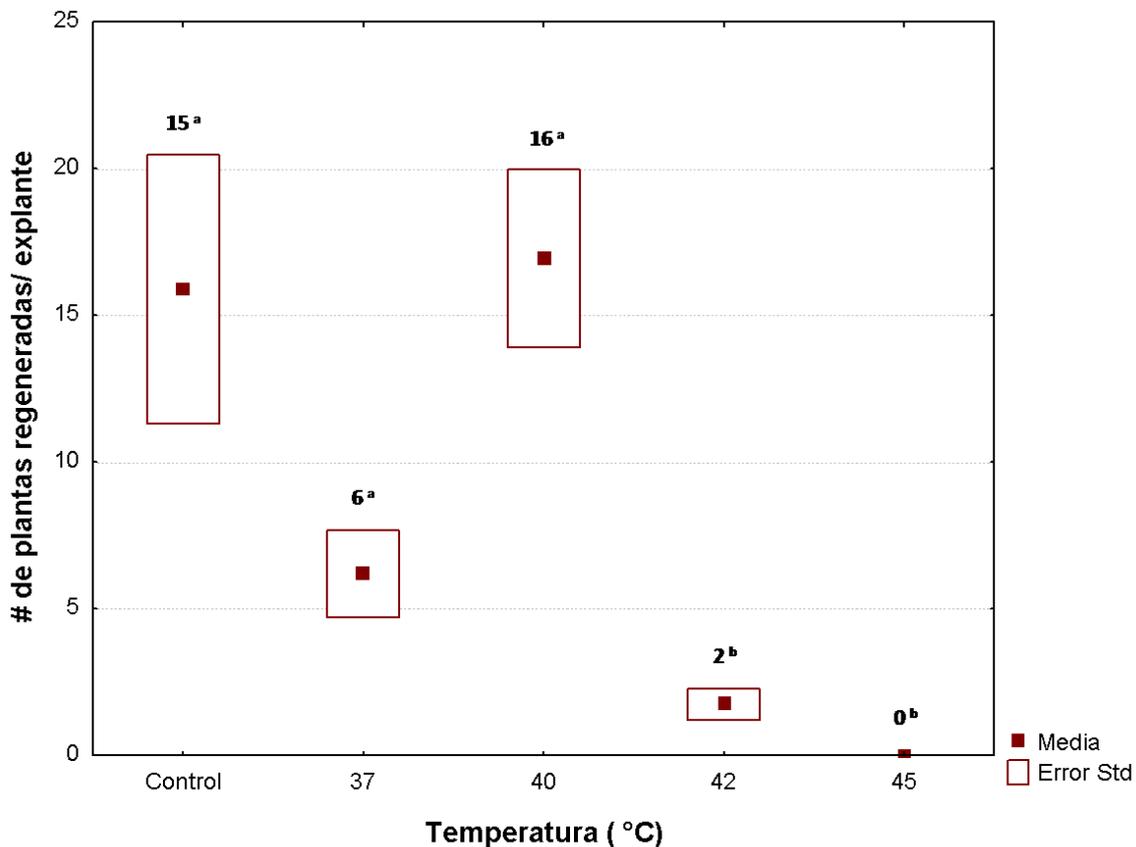


Figura 9. Efecto de las temperaturas 37, 40, 42 y 45°C en el número de plantas de *Digitalis purpurea* regeneradas por disco foliar, en comparación con un control no sometido a golpe térmico, luego de 45 días en medio de cultivo semisólido de regeneración. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

4.2.2 Efecto del golpe térmico en callos de *Digitalis purpurea*

Para la evaluación del efecto del golpe térmico en callos de *D. purpurea*, se transfirieron fragmentos de callos de aproximadamente 0,3 g a medio líquido de formación de callos. Se mantuvieron en baño termostático durante el tiempo seleccionado para desarrollar el golpe de calor. Paralelamente, se conservaron callos en medio de cultivo líquido sin aplicarle estrés por temperatura (25°C). Posteriormente se transfirieron a medio de cultivo semisólido de formación de

callos durante 28 días para la proliferación de los mismos. Luego de transcurrido este tiempo se determinó la masa fresca de los callos.

Al comparar las medias de la masa fresca de los callos de cada uno de los tratamientos (Figura 10), es posible asumir que existe una relación inversamente proporcional entre este parámetro y la temperatura. El aumento de la masa fresca de los callos se corresponde a la proliferación de los mismos, como indicativo de la vitalidad de las células. Por lo que es posible asumir que, a aumentos de la temperatura, superior es la afectación del explante. Este planteamiento se comprobó al determinar que existe una correlación negativa entre ambos parámetros (R de Spearman -0,7, para $p < 0.01$).

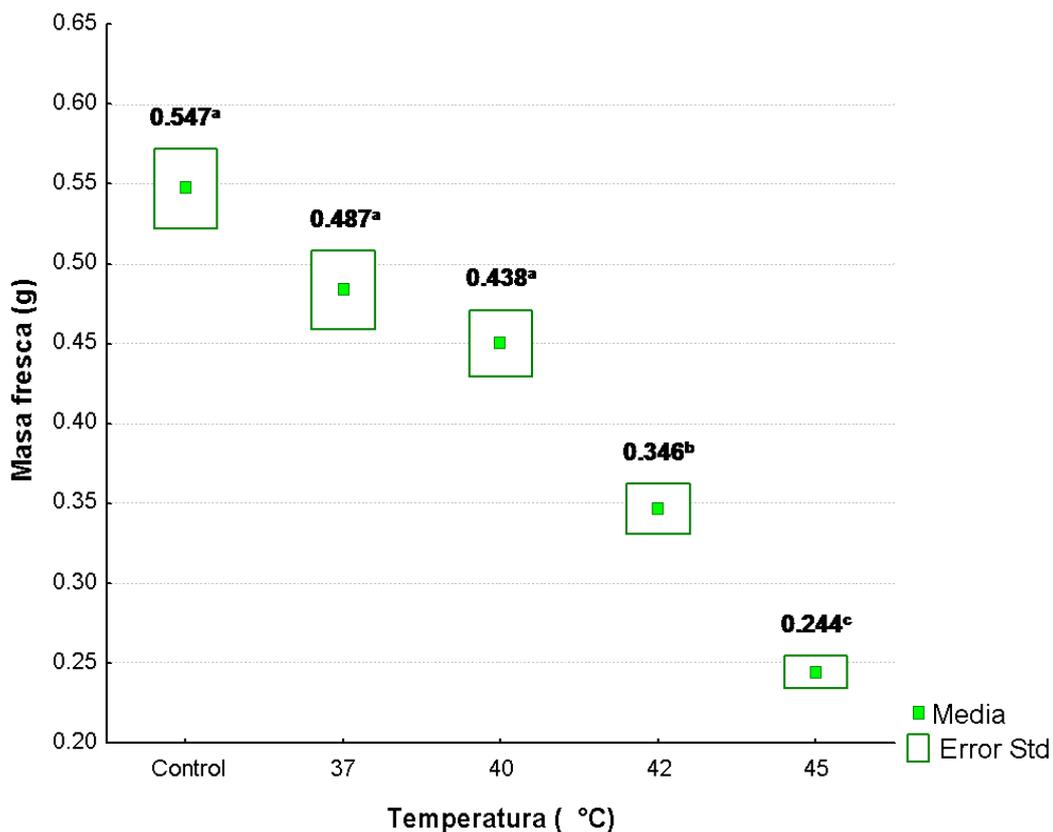


Figura 10. Efecto de las temperaturas 37, 40, 42 y 45°C en la masa fresca de callos de *Digitalis purpurea*, en comparación con un control mantenido a temperatura ambiente de 25°C, luego de 28 días en medio de cultivo semisólido de formación de callos. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

La mayor temperatura a la cual no se detectaron diferencias significativas con respecto al control fue a 40°C. Para los tratamientos sometidos a golpes de calor a 42 y 45°C, se experimentó una disminución significativa de la masa fresca entre sí y con respecto al control, hasta obtener valores similares a la masa inicial de los callos (0,244) (Figura 10).

Este comportamiento es similar al descrito para discos foliares sometidos a las mismas condiciones de tratamiento. Por lo que es de esperar que, al determinarse el número de plantas regeneradas por callos, exista una relación similar, en la cual no se obtengan plantas a partir de los callos mantenidos a 45°C y no se experimenten diferencias significativas entre el control y los explantes expuestos a 37 y 40°C.

Morfológicamente no existen diferencias entre los callos de los tratamientos, fuera del tamaño, la compactación y dureza de los mismos. Estas tres características no son variables para los tratamientos control, 37 y 40°C, mas si para los callos sometidos a 42 y 45°C los cuales eran más pequeños, oscuros, acuosos e incluso necróticos, en el segundo caso.

Luego de la etapa de proliferación de los callos en estudio, fueron transferidos a medio de cultivo de regeneración, con subcultivos cada 15 días. Al transcurrir el periodo del primer subcultivo, fue posible identificar otras diferencias morfológicas entre los tratamientos, fundamentalmente el sometido a 40°C (Figura 11), no apreciables en condiciones de oscuridad.

Durante los primeros 15 días en medio de regeneración, los callos del tratamiento control (Figura 11A) y los sometidos a 37°C (Figura 11B), mantuvieron similitudes en cuanto a tamaño y coloración. Bajo estas condiciones es común que se produzca proliferación celular, por lo que los callos aumentan de tamaño, se engrosan y comienzan la formación de brotes y/o raíces, adoptando una coloración verde paulatinamente. Estas características se mantuvieron en ambos tratamientos, con la aparición de zonas verdes oscuras y ligera formación de raíces.

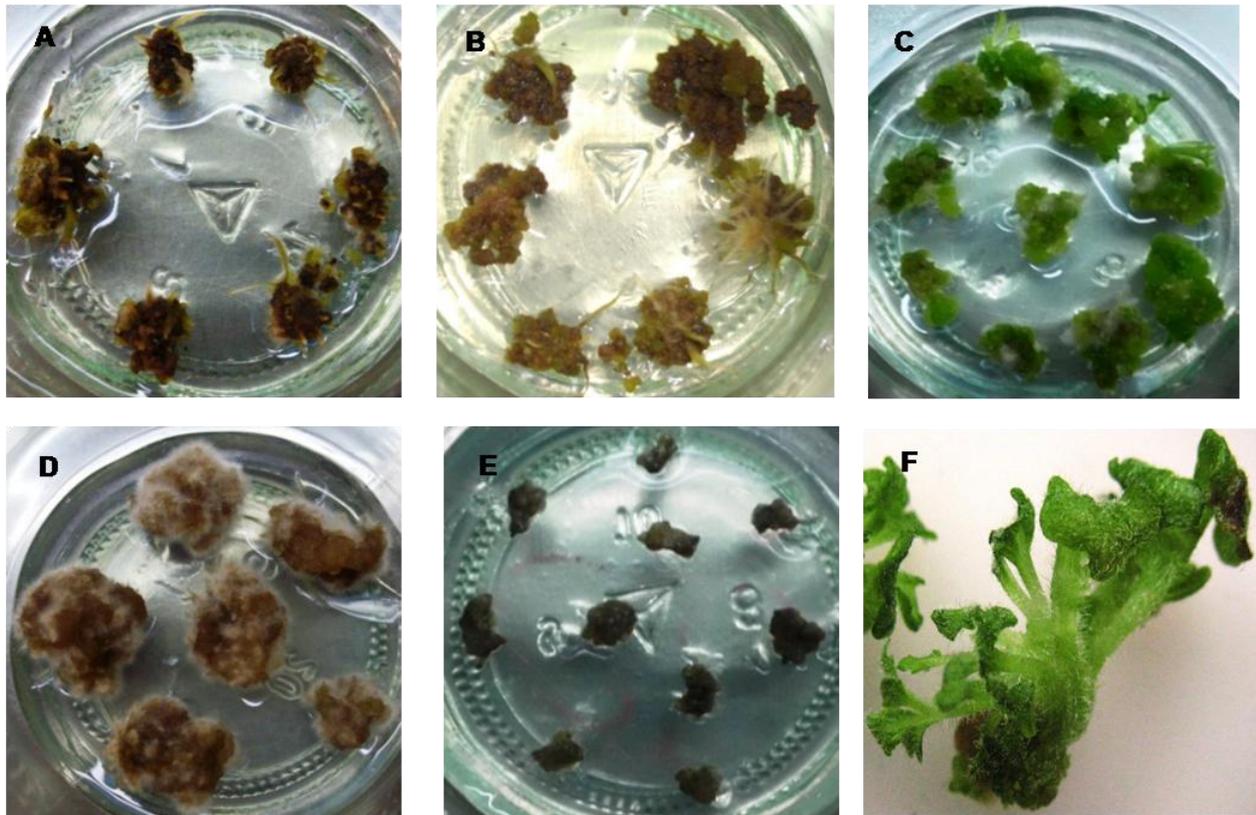


Figura 11. Callos de *Digitalis purpurea* sometidos a golpe térmico a 37 (B), 40 (C), 42 (D) y 45°C (E), en comparación con un control mantenido a 25°C (A), luego de 15 días en medio de cultivo semisólido de regeneración. F: Regeneración de plantas a partir de callos expuestos a 40°C, bajo las mismas condiciones.

Sin embargo, al observar los callos sometidos a golpe térmico a 40°C (Figura 11C), fue posible notar diferencias considerables y de gran interés. La totalidad de los callos adquirieron características morfológicas favorables para la regeneración. Se tornaron más sólidos, compactos, engrosados y de un verde intenso, asociado a una mayor presencia de clorofilas y a la formación de brotes. Consecuentemente con estas características, solo en este tratamiento fue posible la regeneración de plantas a los 15 días (Figura 11F), con una media de tres brotes por explante.

Los callos correspondientes al tratamiento golpeado a 42°C (Figura 11D) mantuvieron similitudes con el control en cuanto a la coloración, sin embargo fue posible observar la aparición de raíces, en algunos casos, antes de los brotes. Adicionalmente, su textura se tornó más suave y acuosa, que los tratamientos anteriormente descritos.

De acuerdo con los resultados esperados, los explantes sometidos al golpe de calor a 45°C (Figura 11E) se mantuvieron oscuros, acuosos y frágiles, no experimentaron proliferación o engrosamiento apreciable.

Luego de 45 días en medio de regeneración, se determinó el número de plantas obtenidas por explante y se compararon los tratamientos. Contrario a los resultados anteriormente discutidos al analizar el efecto del estrés por temperatura en hojas de *D. purpurea*, en el tratamiento mantenido a la temperatura de 40°C, se obtuvieron valores medios significativamente superiores al control y al tratamiento expuesto a 37°C (Figura 12). Adicionalmente, la eficiencia de regeneración del sistema sometido a 42°C es comparable con la alcanzada para 37°C y superior al control. No fue posible regenerar plantas a partir de los callos golpeados a 45°C. De manera consecuente con estos resultados la mayor temperatura a la cual no se ve afectada la regeneración de plantas, bajo las condiciones seleccionadas, es a 42°C. Sin embargo, los altos niveles de regeneración de los callos golpeados a 40°C, no solo son impredecibles e interesantes, sino que inducen a considerar este tratamiento como idóneo para realizar el golpe térmico.

Si comparamos los efectos del golpe térmico entre ambos materiales, de acuerdo a las diferencias entre el número de plantas regeneradas por explante, es posible concluir que las hojas son más sensibles a la temperatura que los callos. En el primer caso la eficiencia de regeneración media oscila entre 6-16 plantas por callos hasta los 40°C (Figura 9), afectándose considerablemente este parámetro a temperaturas superiores. Así es que, el número de plantas regeneradas por explante fue similar para ambos materiales en los tratamientos control y 37°C (Figura 12), así como 40°C para las hojas. Mas, en el caso de los callos se experimentó una regeneración superior a mayores temperaturas, permitiendo que se realice un golpe térmico a 40 o 42°C, sin afectar esta variable. Luego, el empleo de los callos como explante sobre el cual es posible aplicar un golpe térmico, no solo permite designar una temperatura superior, sino que se potencia la regeneración de plantas.

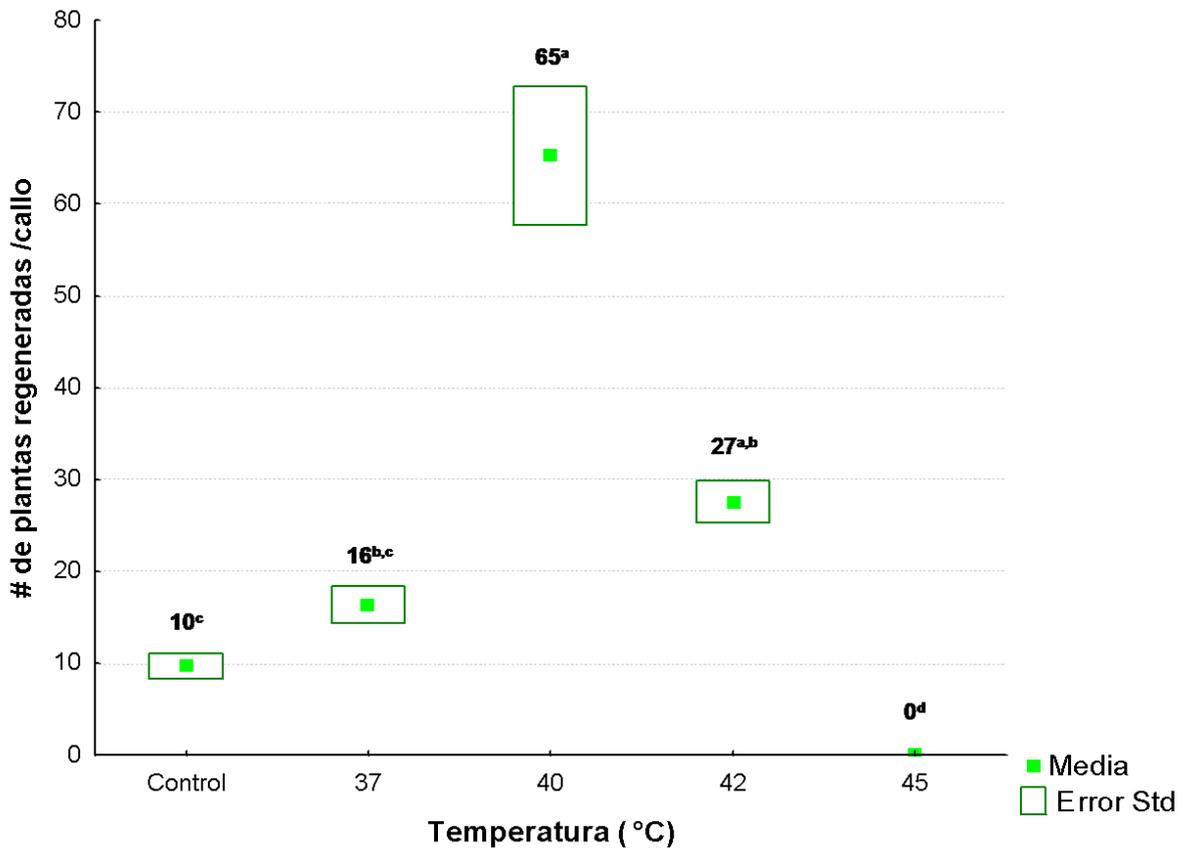


Figura 12. Efecto de las temperaturas 37, 40, 42 y 45°C en el número de plantas de *Digitalis purpurea* regeneradas por callo, en comparación con un control no sometido a golpe térmico (25°C), luego de 45 días en medio de cultivo semisólido de regeneración. Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis.

La menor sensibilidad de los callos de *D. purpurea* al golpe térmico no es sorprendente si se tiene en cuenta que son una masa amorfa de células del parénquima, en crecimiento desorganizado y sin diferenciación obtenida a partir de las hojas. La formación de callos ocurre de modo natural en la planta, como respuesta de protección ante diversos factores bióticos y abióticos, debido a la modificación del equilibrio endógeno de los reguladores de crecimiento. En este caso es provocado por la adición de una auxina sintética (2,4-D) al medio de cultivo, que conlleva a un crecimiento desordenado. Estas características pueden justificar no solo la mayor sensibilidad de las hojas a la temperatura, sino también que no se produzca una respuesta de las mismas ante este estrés.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el proceso de selección con antibiótico se realiza en la etapa de formación y proliferación de callos, la aplicación del golpe térmico en este tejido, permitiría acortar el proceso de obtención de plantas libres de GMS. Por lo que se regenerarían, de manera directa, líneas presumiblemente con las características deseadas.

Luego del análisis de los resultados expuestos en este acápite, es posible seleccionar a los callos como el explante a utilizar, para la eliminación inducida por golpe térmico del gen marcador de selección. Adicionalmente, se proponen las temperaturas de 40 y 42°C, debido a los aumentos considerables en la eficiencia de regeneración para la primera. Sin embargo, ninguno de estos resultados aseguran que pueden ser empleados satisfactoriamente en una metodología de escisión de genes marcadores de selección. Para ello es imprescindible demostrar que bajo estas condiciones es posible activar el promotor inducible por golpe térmico y, consecuentemente, la recombinación.

Por tanto, es necesario transformar discos foliares vía *A. tumefaciens*, con un vector binario que contenga el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox. Realizar el proceso de selección con los antibióticos geneticina o higromicina B, durante la fase de inducción y multiplicación de callos. Posteriormente, aplicar un golpe térmico al explante y temperaturas elegidos, para ver si es posible regenerar plantas en las cuales se produjo la eliminación del segmento de ADN entre los sitios lox. El desarrollo exitoso de este proceso, permitirá proponer una metodología para la obtención de plantas transgénicas de *D. purpurea* libres de genes marcadores de selección.

Aunque a lo largo de este acápite se han analizado y discutido los resultados necesarios para dar cumplimiento al segundo objetivo específico propuesto en este documento, es necesario considerar nuevas incógnitas surgidas de los mismos. Hasta el momento, no existe ninguna referencia de la realización de un estudio acerca del efecto de la aplicación de un golpe térmico en explantes del género *Digitalis*. La novedad de estos resultados se acrecienta si consideramos la potenciación de la regeneración de plantas en los callos sometidos a estrés por temperatura, específicamente a 40°C. Estas evidencias experimentales fueron corroboradas en tres ocasiones, conduciendo a la

aparición de interrogantes, cuyas respuestas permitirían explicar los resultados representados en la Figura 12. Aunque actualmente no se pueden hacer inferencias directas para esta especie, existen diversos estudios en otras plantas modelos como *Arabidopsis thaliana*, que permiten proponer una hipótesis del mecanismo molecular que provoca los cambios fisiológicos, anteriormente descritos para este tratamiento.

La respuesta a golpe térmico es altamente conservada en todas las células vivas, incluyendo las plantas. Por lo que se considera un sistema modelo para el estudio del mecanismo molecular que posibilita la regulación de la expresión génica dependiente de estrés (Shoji *et al.*, 2000). La aplicación de un golpe de calor en un sistema vivo, provoca la disminución del volumen celular y, consecuentemente, el apilamiento de los componentes citoplasmáticos, lo cual aumenta las interacciones moleculares, produciéndose la desnaturalización de proteínas y la fusión de membranas (Sato *et al.*, 2008). Por este motivo las células han desarrollado diversos mecanismos para protegerse y adaptarse a factores abióticos variables y persistentes como este.

Para responder a las condiciones de estrés deben desencadenarse numerosos eventos multifactoriales, que pueden agruparse en dos procesos: biosíntesis de moléculas adaptativas y unión o acoplamiento de moléculas a estructuras organizadas. El primero va a estar dirigido a la protección de macromoléculas y membranas, mientras que el segundo puede estar asociado a cambios del flujo de metabolitos. Posibilitando, de manera conjunta, contrarrestar los efectos del estrés y la aclimatización (Cho *et al.*, 2006).

En todos los organismos sometidos a estrés por temperatura se produce la inducción rápida y acumulación de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de golpe térmico (HSP, del inglés *heat shock protein*), que pueden categorizarse de acuerdo a su peso molecular, homología de secuencia y su localización intracelular (Shakeel *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012). La inducción de la transcripción de genes de golpe térmico ante altas temperaturas, está mediada por activadores transcripcionales pre-existentes, conocidos como factores de golpe térmico (HSF,

del inglés *heat shock factors*). Los HSFs son capaces de unirse a elementos (HSE, del inglés *heat shock elements*) situados en regiones del promotor, asociados a esta señal.

Los genes a partir de los cuales se obtienen los HSFs han sido aislados y caracterizados para diversos organismos, como tomate (Scharf *et al.*, 1990), *Arabidopsis* (Hubel *et al.*, 1994; Busch *et al.*, 2005; Nishizawa *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009), maíz (Gagliardi *et al.*, 1995), soya (Czarnecka-Verner *et al.*, 1995), tabaco (Shoji *et al.*, 2000) y arroz (Yamanouchi *et al.*, 2002). El estudio funcional de estos factores transcripcionales, ha permitido demostrar que su potenciación favorece diversos procesos, como la termotolerancia, germinación y estrés hídrico (Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2011).

Aunque el número de genes que codifican para proteínas de golpe térmico de pequeño peso molecular (sHSP, del inglés *small heat shock protein*), es variado para diversos organismos, su mayor abundancia y multiplicidad se encuentra en las plantas: 19 en *Arabidopsis*, 17 en trigo y 12 en maíz (Zhou *et al.*, 2012). Lo cual está respaldado por el hecho de que las plantas son organismos sésiles, que se encuentran continuamente expuestos a cambios en diversos factores abióticos, como déficit de agua o temperaturas extremas. Para adaptarse a estos y otros cambios las plantas deben someterse a disímiles cambios fisiológicos e inducir gran número de genes (Cho *et al.*, 2006). Las HSPs actúan como chaperonas moleculares que se encargan de reparar y asistir la re-naturalización de proteínas sensibles al estrés, protegiendo a las células de su efecto (Sato *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2011). Además, pueden elegir como blanco proteínas desnaturalizadas o agregadas e inducir su degradación (Cho *et al.*, 2006).

A pesar de que las sHSPs han sido detectadas en respuesta a altas temperaturas, también pueden estar asociadas a otras señales abióticas (frío, sequía, salinidad) o moleculares (ácido abscísico, ácido salicílico, H₂O₂) (Sun *et al.*, 2012). Este efecto está asociado a la alta complejidad de los mecanismos de activación de rutas defensivas y aclimatación, de acuerdo a los eventos de señalización relacionados con la sensibilidad a estrés. Por lo que se puede desarrollar una tolerancia cruzada, debido a la protección simultánea que se establece por el solapamiento entre

los grupos de genes activados. Se ha demostrado que la aplicación de un golpe térmico, induce en células de plantas la resistencia cruzada a salinidad, metales tóxicos, daño por enfriamiento y estrés oxidativo (Sato *et al.*, 2008). Consecuentemente, la modificación genética con el objetivo de sobre-expresar sHSPs, ha permitido aumentar caracteres agronómicos como la tolerancia basal al calor, el enfriamiento y el estrés osmótico, así como ha aumentado la longevidad y germinación de semillas (Zhou *et al.*, 2012).

Aunque se conoce menos acerca del efecto sobre el metabolismo al producirse la respuesta a estrés térmico, se plantea que puede influir principalmente en rutas asociadas a la obtención y degradación de carbohidratos, así como en la homeostasis redox. En una revisión realizada por Zou *et al.* (2011), sobre la respuesta ante estrés por altas temperaturas en arroz, se plantea que existe influencia en rutas como la glucólisis, el Ciclo de Krebs, la biosíntesis de tiamina y ambas fases de la fotosíntesis. Adicionalmente, se potencia la expresión de enzimas involucradas en sistemas antioxidantes como la glutatión S-transferasa, deshidroascorbato reductasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa (Zou *et al.*, 2011).

Las características de la respuesta por golpe térmico analizadas hasta el momento, permiten identificar una serie de eventos moleculares que inducen múltiples procesos metabólicos y cambios fisiológicos. Sin embargo, no explican la relación entre estos y los cambios morfológicos experimentados en los callos de *D. purpurea* sometidos a temperaturas de 40°C, o la potenciación de su regeneración. En un estudio realizado por Kumar *et al.* (1999) en tres variedades de *Gladiolus hybridus* Hort, fue posible demostrar el efecto sinérgico del golpe térmico (50°C, 1h) y altas concentraciones de sacarosa (0.232, 0.290, 0.348 M) en el proceso de morfogénesis. Adicionalmente, la aplicación de altas temperaturas potenció la proliferación de brotes en los explantes mantenidos en medio basal (Kumar *et al.*, 1999).

El curso de la regeneración en cultivo *in vitro* está determinado por la relación entre auxinas y citoquininas, las cuales actúan de manera concertada para promover diversos procesos de crecimiento y desarrollo en plantas superiores. Algunos cultivos como tabaco responden a las

citoquininas adoptando una coloración verde en presencia de luz, acumulando ARNs mensajeros y/o proteínas de los centros de reacción fotosintéticos.

Estímulos como moléculas elicitoras, metales pesados y golpe térmico, pueden activar enzimas como la citoquinina oxidasa, también inducida por esta hormona (Dominov *et al.*, 1992). Esta enzima es crucial en el catabolismo del exceso de citoquininas y previene el movimiento dentro y fuera de tejidos u órganos específicos (Mok y Mok, 2001)

En estudios funcionales de librerías de ADN complementario (ADNc), realizados por Banno *et al.* (2001), en *Arabidopsis*, fue posible dilucidar moléculas involucradas en la potenciación de la regeneración de brotes. El ADNc ESR1 (del inglés *enhanced shoot regeneration*), permite la formación de brotes de manera independiente a la concentración de citoquininas y el enverdecimiento de manera específica, cuando es sobre-expresado en explantes radiculares. Dicho incremento se produce durante las etapas tempranas del proceso de regeneración de brotes, sin afectar la inducción de callos o la formación de raíz. Sin embargo, si el explante no es transferido de un medio con 2,4-D no se induce la expresión de ESR1. Luego, en un análisis de la relación estructural y funcional de ESR1, se propone que sea un factor de transcripción que pertenece a la familia AP2/EREBP (del inglés *APETALA2/ethylene-responsive elements binding protein*), la cual es inducida por etileno. Su efecto es independiente de citoquininas, pero sinérgico en presencia de estas y requiere de la incubación con 2,4-D (Banno *et al.*, 2001).

Las coincidencias entre la respuesta generada por el factor ESR1 de *Arabidopsis* y el efecto del golpe térmico en la regeneración de callos de *D. purpurea*, permiten elaborar una hipótesis que justifique estos resultados. La aplicación del estrés por temperatura a 40°C, podría inducir la activación de HSFs y la expresión de HSPs que modifiquen la relación entre auxinas y citoquininas, activando la acción de la segunda (D'Agostino y Kieber, 1999). Posteriormente, la síntesis de sHSPs de cloroplastos, permitiría proteger el Fotosistema II y los tilacoides de la labilidad por estrés. Ambos procesos justifican el enverdecimiento notable de los callos al ser transferidos a la luz, en medio de regeneración con AIA y 6-BAP. Adicionalmente, la tolerancia cruzada de las respuestas adaptativas, posibilitaría generar la transcripción de moléculas funcionalmente similares

al ESR1, de acuerdo con la inducción y multiplicación previa de los callos en medio con 2,4-D, provocando un aumento en la formación de brotes.

Mientras que, para los callos sometidos a 42°C varios factores pueden provocar que no se observen cambios morfológicos, aunque exista un aumento significativo de la regeneración. Entre ellos es posible teorizar: la combinación del enmascaramiento del efecto de las citoquininas con otras hormonas o la regulación negativa de la expresión de genes involucrados en su efecto (Rashotte *et al.*, 2003), la activación de citoquinina oxidasas y el aumento del daño celular.

Para comprobar estas hipótesis y dilucidar las causas de la potenciación de la regeneración de callos de *D. purpurea* sometidos a golpe térmico, es necesario realizar múltiples estudios moleculares, metabólicos y fisiológicos. Tal vez la descripción del mecanismo y las moléculas involucradas en este proceso, permita revolucionar las metodologías utilizadas hasta el momento, alcanzar mayor eficiencia de regeneración y aumentos en la productividad y contenido de cardenólicos.

4.3. Obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* libres de marcador de selección

Para la obtención de plantas transgénicas de *D. purpurea* se transformaron discos foliares vía *A. tumefaciens*, empleando el vector binario pAthsp-A y como controles se utilizaron los vectores binarios pTJK136, pCAMBIA1301 según el protocolo propuesto por Izquierdo (2010). Paralelamente se cultivaron bajo las mismas condiciones, explantes sin transformar.

Luego de transcurrido el periodo de co-cultivo del tejido vegetal con la bacteria (cinco días), se realizó la determinación histoquímica del producto de expresión transitoria de β -glucuronidasa, en discos transformados con los plásmidos que contienen el gen *uidA* (pTJK136, pCAMBIA1301) y un control sin transformar, seleccionados al azar (Figura 13). Los niveles de expresión de esta enzima están asociados a la aparición de un precipitado de color azul, que se produce por la acción de la misma sobre su sustrato (X-Gluc). De acuerdo a los resultados esperados, fue posible observar manchas y puntos azules en los bordes de los discos transformados, a diferencia del control. La localización del producto de catálisis de la β -glucuronidasa, se corresponde con las zonas donde se realizaron cortes, favoreciendo la interacción con *A. tumefaciens*.

La expresión transitoria de la enzima codificada por el gen *uidA*, permite comprobar la inserción del mismo de forma rápida y detectable, demostrando la eficiencia de las condiciones de transformación y su aplicabilidad. Adicionalmente, se manifiesta la funcionalidad del plásmido pCAMBIA1301 en la modificación genética de plantas de *D. purpurea*.

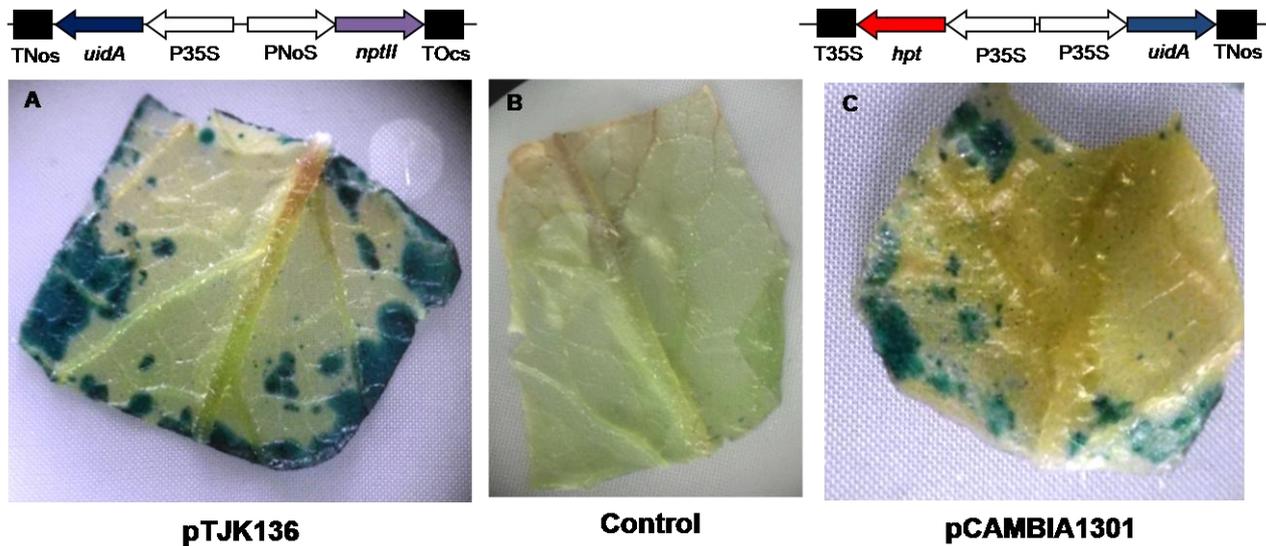


Figura 13: Expresión transitoria de la enzima β -glucuronidasa en discos foliares de *D. purpurea* luego de cinco días en medio de cultivo semisólido de formación de callos con acetosiringona 200 μ M. **A** y **C**: en co-cultivo con *A. tumefaciens* transformado con los vectores pTJK136 y pC1301, respectivamente. **B**: no transformado.

Los genes reporteros más comúnmente introducidos en plantas genéticamente transformadas son los codificantes para la proteína verde fluorescente (*gfp*) y la enzima β -glucuronidasa (*uidA*). Estos son empleados para el análisis de patrones de expresión gobernados por diversos promotores, permitiendo el reconocimiento y seguimiento visual del tejido transformado. La selección del gen reportero está determinada por su estabilidad, período de actividad y las señales de fondo que pueden interferir en su observación (Kavita y Kumar, 2008).

La principal desventaja del empleo del gen *uidA* como reportero, radica en la pérdida del material vegetal, debido a que es necesario incubar el explante con X-Gluc. Adicionalmente, la clorofila debe ser eliminada, para que no se produzcan interferencias en la observación del producto. Sin

embargo, en el caso de este estudio no es un detrimento, pues los discos foliares transformados con los vectores pTJK136 y pCAMBIA1301, se emplean con el objetivo de comprobar si las condiciones de transformación fueron eficientes.

En los días sucesivos al co-cultivo, los discos foliares transformados con los vectores pTJK136 y pCAMBIA1301, fueron transferidos a medio de cultivo semisólido de formación de callos, con geneticina e higromicina, respectivamente. Los callos multiplicados bajo las condiciones selectivas anteriormente mencionadas, se trasladaron a medio de regeneración. Fue posible observar el producto de la expresión estable de la enzima β -glucuronidasa, en callos y plantas seleccionados con G418 (Figura 14). No fue posible regenerar plantas que contuvieran el gen *uidA*, luego de la selección con higromicina.

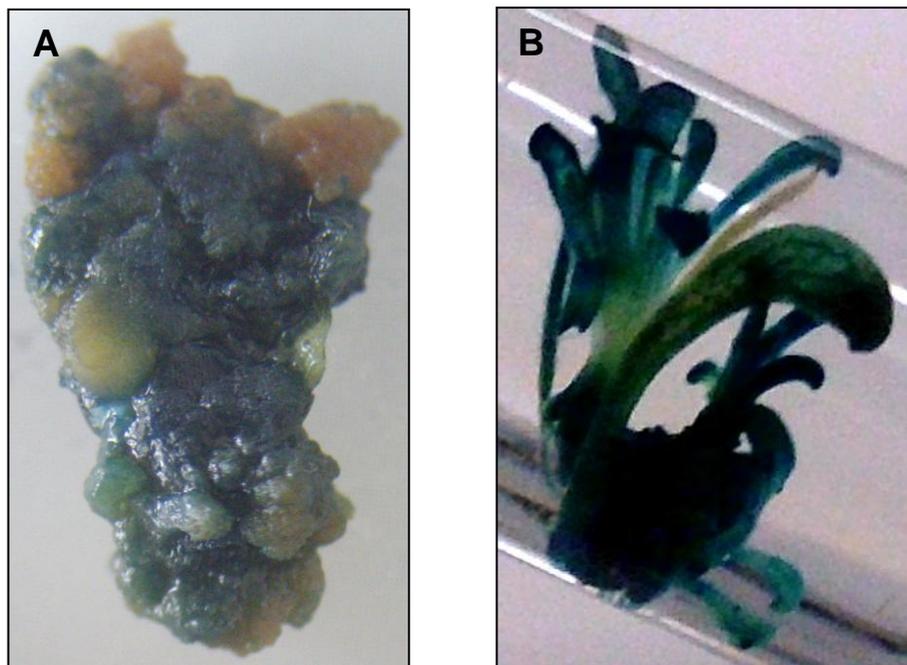


Figura 14: Expresión estable de la enzima β -glucuronidasa en callos (A) y plantas (B) de *D. purpurea* transformados con el vector pTJK136.

La obtención de callos resistentes a geneticina capaces de expresar de manera simultánea los genes *nptII* y *uidA*, se corresponde con los resultados presentados por Izquierdo (2010) durante el desarrollo de un protocolo de transformación en esta especie. Confirmando la reproducibilidad y aplicabilidad de las condiciones de transformación propuestas.

4.3.1 Selección y regeneración de plantas transformadas de *D. purpurea*

Los discos foliares transformados con los vectores pAthsp-A, pTJK136 y pCAMBIA1301, fueron seleccionados durante ocho semanas en MFC, con subcultivos cada 14 días. Se emplearon como agentes selectivos higromicina B y geneticina a las concentraciones de 12 y 70 mg/L, respectivamente (ver acápite 4.1). Paralelamente se utilizaron controles no transformados en presencia y ausencia de antibiótico.

A los 28 días de iniciación del proceso de inducción de callos, se observó el grado de formación de los mismos por explante y se compararon los diferentes tratamientos (Figura 15). En los discos foliares no transformados en ausencia de selección, se produjo formación de callos en el 75-100% de su área (Figura 15A). Mientras que en los controles seleccionados con higromicina B (Figura 15B) y geneticina (Figura 15C), no fue posible observar callos. Los discos foliares transformados con los vectores binarios y sometidos a selección, mantuvieron una gran variabilidad en estos resultados, desde fragmentos que no formaron callos, hasta la aparición de los mismos en un 50% de su área.

El empleo de un control sin transformar no sometido a selección, permite comprobar las condiciones del medio de cultivo y la capacidad de inducción de callos. Consecuentemente, el resultado esperado es que se produzca una formación normal de dichas estructuras sobre el explante, asegurando que no existan otros efectos inhibitorios en los callos transformados, además de la presencia del agente selectivo. Mientras que los discos foliares no transformados en presencia de higromicina o geneticina, posibilitan acreditar la eficiencia de las condiciones de selección propuestas y las aplicadas. Si no existe una inhibición total de la formación de callos, aumenta la probabilidad de que se produzcan escapes del proceso selectivo. Los resultados alcanzados se corresponden con los esperados para llevar a cabo un proceso selectivo exitoso.

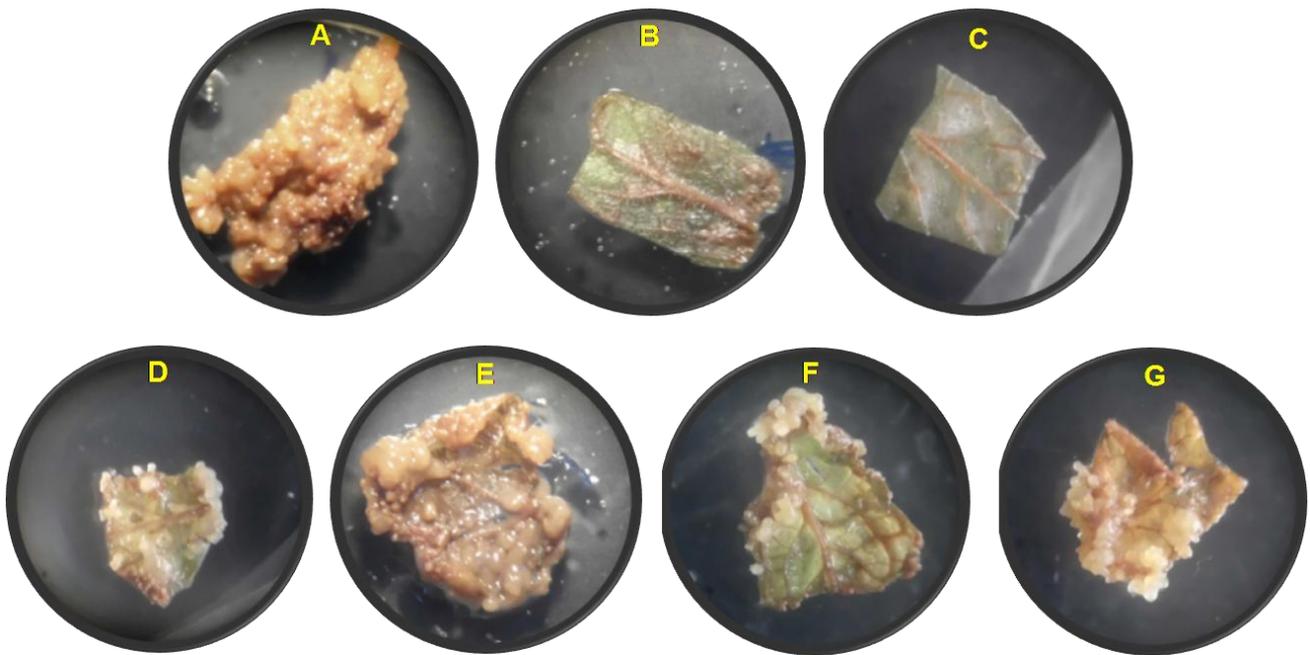


Figura 15: Discos foliares de *D. purpurea* luego de 28 días en medio de cultivo semisólido de formación de callos. Proceso selectivo de células transformadas con geneticina 70 mg/L e higromicina 12 mg/L, con respecto a controles sin transformar en presencia y ausencia de antibiótico. **A:** Control no transformado sin antibiótico, **B:** Control no transformado con higromicina B, **C:** Control no transformado con geneticina, **D y E:** discos foliares transformados con los vectores pTJK136 y pCAMBIA1301, respectivamente. **F y G:** discos foliares transformados con el plásmido pAthsp-A en medio selectivo con higromicina B y geneticina, respectivamente.

Los discos foliares transformados con los vectores pTJK136 y pCAMBIA1301 son empleados como controles positivos de ambos agentes selectivos, al contener los genes *nptII* y *hpt*, respectivamente. Adicionalmente, la presencia del gen reportero *uidA* en su estructura, permite monitorear de forma sencilla la expresión estable de estos durante los procesos de formación de callos y regeneración de plantas. La eficiencia de transformación con el plásmido pCAMBIA1301 fue considerablemente inferior a la del pTJK136, siendo imposible regenerar plantas a partir de este tratamiento. Este resultado puede estar asociado a la pérdida por contaminación de material transformado, la producción de eventos de modificación en menor número o en zonas del genoma que afecten la viabilidad celular, así como diferencias en los patrones de expresión de los GMS, gobernados por diferentes promotores.

La obtención de callos y la regeneración de plantas modificadas con el vector pAthsp-A, constituyó el objetivo fundamental del proceso de transformación. La presencia del sistema de escisión sitio-específico Cre//lox, permite comprobar si es posible activar la inducción de la expresión de la recombinasa, mediante la aplicación de un golpe térmico en callos, a las temperaturas de 40 y 42°C. Este plásmido contiene entre sus sitios lox, el gen *hpt*, que confiere resistencia a higromicina B, y fuera de estos al gen *nptII*, codificante para la neomicina fosfotransferasa, enzima que inactiva el efecto de la geneticina. Por lo tanto es posible aplicar ambos antibióticos en el proceso de selección de los eventos transgénicos desarrollados por la introducción del pAthsp-A en el genoma de la planta. Por tanto el 50% de los explantes transformados se mantuvieron en medio de cultivo con geneticina y los restantes con higromicina B. Permitiendo comprobar la funcionalidad de ambos genes en *D. purpurea*.

Los callos multiplicados en medio de cultivo con el agente selectivo correspondiente, fueron sometidos indistintamente a 40 y 42°C, mantenidos 15 días en recuperación en MFC y posteriormente transferidos a medio de regeneración. Fue posible obtener plantas del control sin antibiótico y las líneas transformadas con los vectores pAthsp-A y pTJK136.

4.3.2 Análisis mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las líneas de plantas regeneradas

Las líneas de plantas transformadas con el vector binario pAthsp-A, regeneradas a partir de callos sometidos a golpe térmico a 40 y 42°C, fueron evaluadas mediante PCR. Para comprobar la presencia del ADN-T y la escisión de los genes marcadores de selección, se emplearon dos juegos de cebadores (ver acápite 3.3.2). Los primeros (C3300-F y *nptII*-SR) son complementarios a segmentos de ADN no incluidos entre los sitios lox. Por tanto, si se produce la escisión de los GMS, es posible observar el patrón electroforético correspondiente a un segmento de 724 pb, de lo contrario se amplificaría gran parte del ADN-T (alrededor de 8 kpb). En las condiciones de PCR empleadas no se observa el resultado de la polimerización del fragmento de mayor peso molecular (Figura 16A). La ausencia de este producto de PCR imposibilita discernir entre las plantas que aún contienen los genes marcadores de selección y las no transformadas debido a escapes del evento

de selección. Esta dicotomía puede solucionarse con el segundo juego de cebadores (*codA-1* y *nptII-SR*) que permiten amplificar un segmento de ADN de 1441 pb, incluyendo un sitio *lox* y parte de los genes *codA* y *nptII*. Si se produce la aparición de este fragmento, es posible confirmar la inserción del sistema Cre/*lox* contenido en pAthsp-A (Figura 16B).

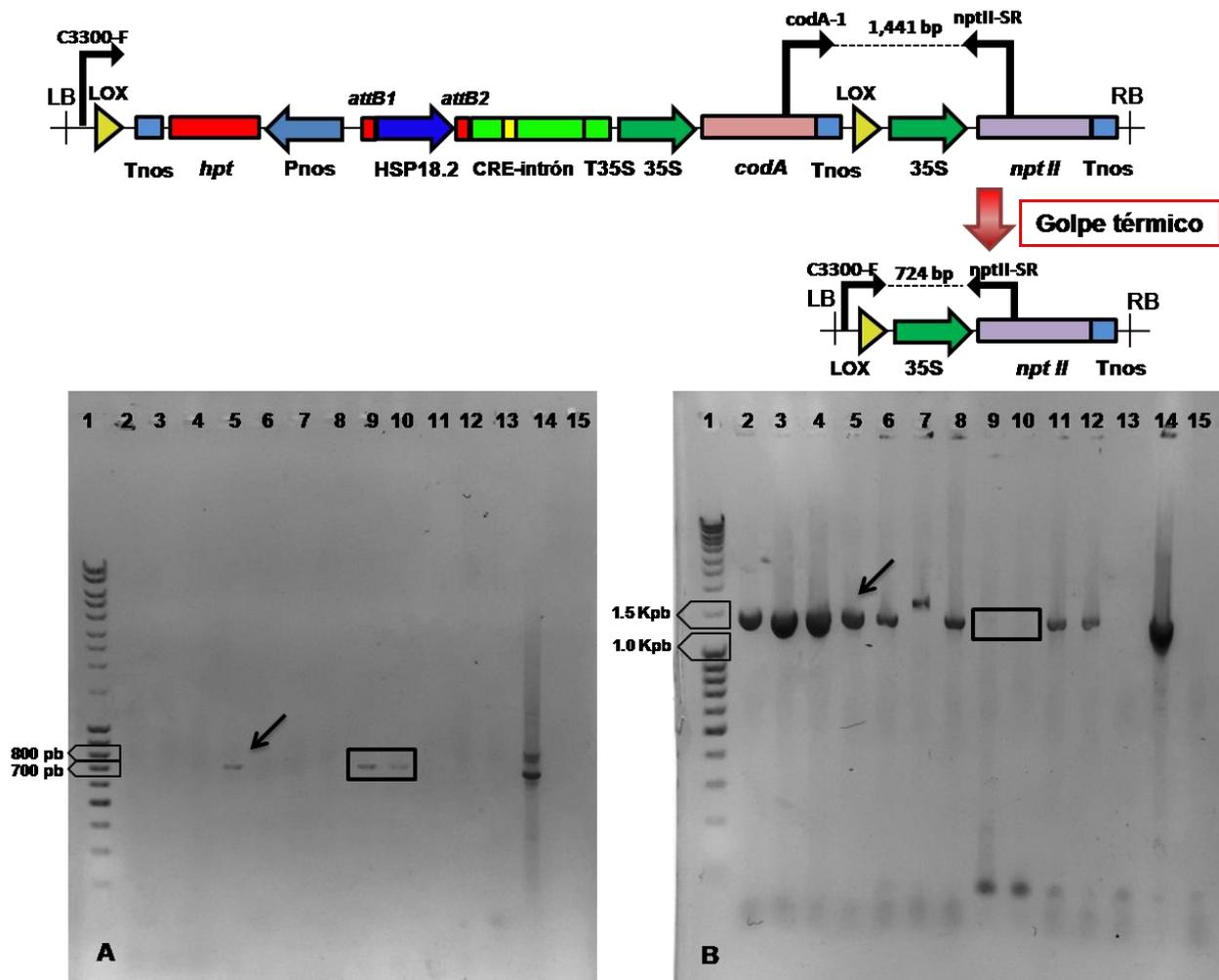


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR con los cebadores C3300-F/*nptII-SR* (A) y *codA-1/nptII-SR* (B). 2-10: Líneas transformadas con el plásmido pAthsp-A regeneradas de callos sometidos a golpe térmico a 42°C, 11-12: Líneas transformadas con el plásmido pAthsp-A regeneradas de callos sometidos a golpe térmico a 40°C, 12: planta no transformada; 13: Control positivo con el plásmido pAthsp-A; 14: Control negativo y 1: Marcador de peso molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Fue posible observar la aparición de patrones electroforéticos resultantes de la amplificación por PCR en todas las líneas de plantas transformadas analizadas, lo cual confirma el éxito de la

transgénesis y del proceso de selección. Sin embargo, solo en las líneas sometidas a 42°C (carriles 5, 9 y 10) se produjo la escisión de los GMS. Estos resultados no permiten arribar a conclusiones acerca de la eficacia de la inducción de la recombinación a 40°C, o de la eficiencia de la escisión a 42°C, debido al pequeño tamaño de muestra analizado. Mas es permisible regenerar plantas libres de GMS, luego de la aplicación de un golpe térmico a 42°C en callos de *D. purpurea* que contengan el sistema de escisión sitio-específico Cre/lox.

En el carril 5 de ambas electroforesis se observan los patrones asociados a la amplificación de los segmentos de 1441 y 724 pb, lo que se corresponde con una escisión incompleta del segmento de ADN situado entre los sitios *lox* del pAthsp-A. Este efecto puede deberse a la inserción de varias copias del ADN-T en zonas del genoma vegetal, no siendo posible activar la recombinación en todas; o a la no inducción de la expresión del gen *cre* de manera integral en las células (Chong-Pérez *et al.*, 2012). Este último origina un mosaicismo en este organismo, debido a las diferencias en el material genético de las células, que les permite expresar fenotipos diferentes. En una revisión realizada por Gidoni *et al.* (2008) en trabajos en los cuales se emplea el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox activado por golpe térmico, se analizan aspectos como la eficiencia y el completamiento del evento de escisión. En todos los casos se produce la eliminación de GMS en menos de un 100% de las plantas evaluadas y en la mayoría se producen escisiones incompletas.

Las similitudes entre esta investigación y la metodología desarrollada por Chong-Pérez *et al.* (2012) en bananos, permite comparar los resultados. En ambas se emplea el vector pAthsp-A (que contiene el promotor inducible por golpe térmico HSP18.2 de *A. thaliana*), obteniéndose plantas transgénicas libres GMS a partir de la aplicación de 42°C dos veces durante dos horas, con 16 horas de recuperación entre ellos, en el explante seleccionado. Consecuentemente, se puede inferir que las condiciones seleccionadas para la inducción de la auto-escisión por golpe térmico, constituyen una herramienta aplicable, permitiendo desarrollar una metodología de eliminación de genes marcadores de selección (Figura 17).

Se requieren de análisis moleculares posteriores que permitan corroborar los resultados alcanzados en el PCR. Con el análisis por hibridación de Southern podría confirmarse si el caso de la línea 5 se debe a la existencia de genotipos diferentes, o a la inserción de varias copias del ADN-T en su genoma. Además, estudios posteriores permitirán dilucidar la estabilidad y eficiencia de la metodología propuesta. Estos podrían realizarse mediante análisis fenotípicos de fragmentos foliares de líneas que contengan el ADN-T del vector pAthsp-A y el empleo de los mismos para la formación de callos, como explante idóneo seleccionado para aplicar el golpe térmico. Adicionalmente, es necesario verificar si es posible activar la recombinación a 40°C con el tratamiento de golpe térmico empleado.

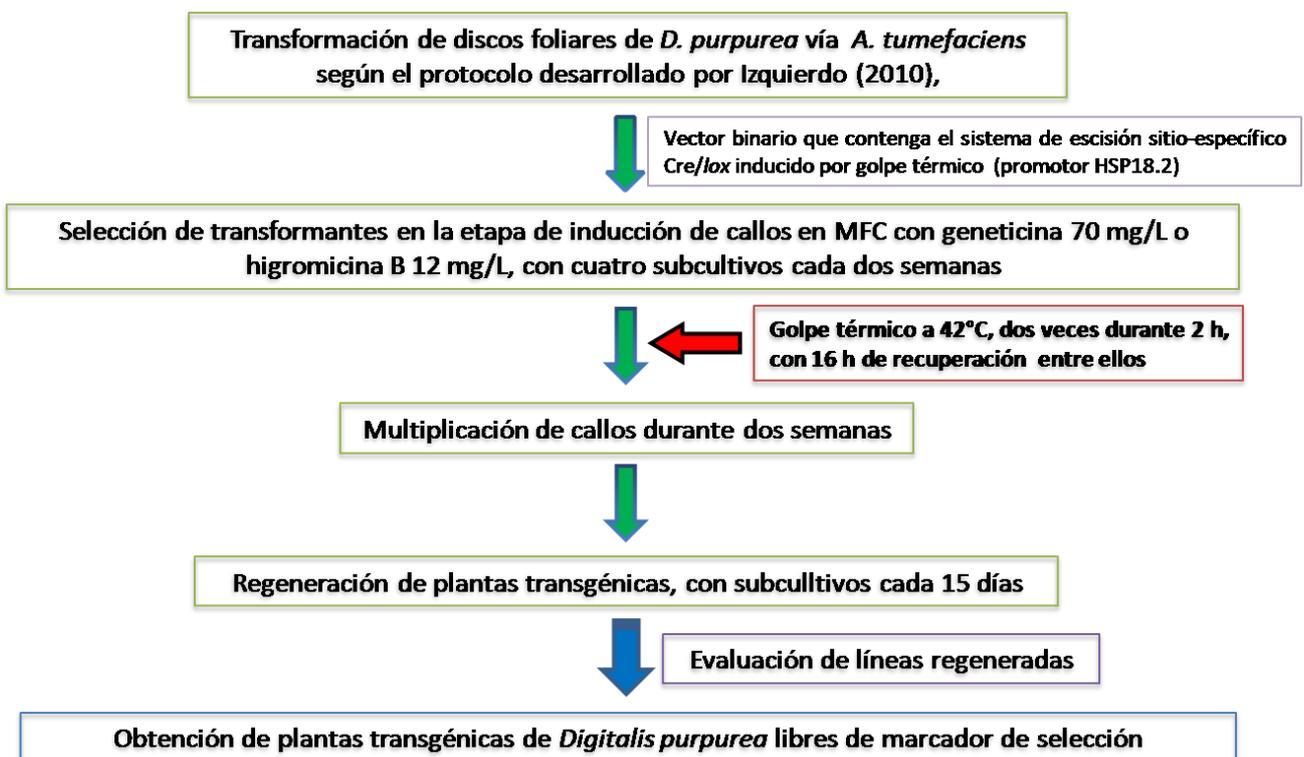


Figura 17: Representación esquemática de la metodología para la escisión de genes marcadores de selección, mediante el uso del sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox, en plantas transgénicas de *Digitalis purpurea*.

Así mismo, el sistema de escisión podría ser optimizado mediante variaciones en la temperatura y duración del estrés, haciendo un análisis del nivel de transcritos del gen *cre* obtenidos inmediatamente después de aplicado el golpe de calor. El presente trabajo ha permitido realizar

aportes metodológicos y cognoscitivos, que posibilitarán obtener plantas transgénicas de *D. purpurea* con una producción elevada y uniforme de cardenólicos, libres de genes marcadores de selección. Además, se esbozan nuevas interrogantes acerca del mecanismo de respuesta a golpe térmico desarrollado en esta especie y los cambios fisiológicos asociados a este estímulo.

CONCLUSIONES

1. Se seleccionó la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de inducción de callos de *D. purpurea*,
2. Se seleccionó la temperatura y tipo de explante para su empleo en un sistema de escisión inducido por golpe térmico,
3. Fue posible obtener plantas transgénicas de *D. purpurea* libres de marcador de selección, evaluadas mediante la técnica de PCR,
4. Se desarrolló una metodología de escisión de genes marcadores de selección, empleando el sistema de recombinación sitio-específico Cre/lox inducido por golpe térmico.

RECOMENDACIONES

- I. Realizar estudios moleculares y fisiológicos del efecto del golpe térmico en la regeneración de callos de *D. purpurea*,
- II. Comprobar si es posible la escisión de genes marcadores de selección aplicando un golpe térmico a 40°C en plantas transgénicas que contengan el ADN-T del vector pAthsp-A,
- III. Obtener mayor cantidad de plantas transgénicas con el objetivo de estudiar la eficiencia de la metodología propuesta,
- IV. Realizar análisis moleculares por hibridación de Southern de las líneas obtenidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agostino I. y Kieber J. (1999).** Molecular mechanisms of cytokinin action. **Current Opinion in Plant Biology 2: 359–364**
2. **Akbudak M.A. y Srivastava V. (2011)** Improved FLP recombinase, FLP_e, efficiently removes marker gene from transgene locus developed by Cre–lox mediated site-specific gene integration in rice. **Mol. Biotech. 49: 82-89**
3. **Aperia, A. (2007).** New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of INTERNAL MEDICINE 44–52 doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01745.x**
4. **Araki H., Jearnpipatkul A., Tatsumi H., Sakurai T., Ushio K., Muta T., Oshima Y. (1985)** Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. **J. Mol. Biol. 182: 191–203**
5. **Banno H., Ikeda Y., Niu Q.W., Chua N.H. (2001)** Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. **Plant Cell 13: 2609–2618**
6. **Bauer P., Munkert J., Brydziun M., Burda E., muller-Uri F., Groger H., Muller Y.A., Kreis W. (2010).** Highly conserved progesterone 5 β -reductase genes (P5 β R) from 5 β -cardenolide-free and 5 β -cardenolide producing angiosperms. **Phytochemistry 71 1495-1505**
7. **Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.D. (1983)** A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature 304: 184-187**
8. **Blochlinger K. y Diggelmann H. (1984)** Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. **Mol. Cell. Biol. 4: 2929-2931**
9. **Busch W., Wunderlich M., Schoffl F. (2005).** Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal 41, 1–14**
10. **Cacho M., Morán M., Herrera M.T. y Fernández-Tárrago J. (1991).** Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25(2): 117-123**
11. **Capell T. y Christou P. (2004)** Progress in plant metabolic engineering. **Current Opinion in Biotechnology 15:148–154**
12. **Chaturvedi H. C. y Jain M. (1994).** Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture of *Digitalis purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38(1): 73-75**
13. **Chiu F. y Watson T. (1985).** Conformational factors in cardiac glycoside activity. **J Med Chem 28(4): 509-515**
14. **Cho E. K., Bong H.C.. 2006.** Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports 25: 349–358**
15. **Chong-Pérez B., Kosky R.G., Reyes M., Rojas L., Ocaña B., Tejeda M., Pérez B., Geert A. (2012).** Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. **Journal of Biotechnology, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.031**
16. **Chong-Pérez B., Pérez-Alonso N., Occeguera Z., Capote A. y Pérez A. (2008).** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Geneticina G418 en el proceso de formación de callos de *Digitalis purpurea* L. **Biociencia Aplicada 8(2): 115–118**
17. **Corduan, G y Spix, C (1975).** Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. **Planta 124(1): 1-11**

18. **Cotsaftis, O., Sallaud, C., Breitler, J.C., Meynard, D., Greco, R., Pereira, A., Guiderdoni, E. (2002)** Transposon-mediated generation of marker free rice plants containing a Bt endotoxin gene conferring insect resistance. **Mol. Breeding 10: 165–180**
19. **Cox, M.M. (1983)** The FLP protein of the yeast 2 mm plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4223-4227**
20. **Cuellar, W., Gaudin, A., Solorzano, D., Casas, A., Nopo, L., Chudalayandi, P., Medrano, G., Kreuze, J., Ghislain, M. (2006)** Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible *Cre-loxP* system from transgenic potato. **Plant Mol. Biol. 62: 71-82**
21. **Czarnecka-Verner E., Yuan C.X., Fox P.C., Gurley W.B. (1995)** Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean. **Plant Mol Biol 29:37–51**
22. **Darbani B., Eimanifar A., Stewart C.N. Jr, Camargo W.N. (2007)** Methods to produce marker-free transgenic plants. **Biotechnol. J. 2: 83-90.**
23. **de Vries J. y Wackernagel W. (2002)** Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 2094-2099.**
24. **Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., y Leemans, J. (1987).** Efficient octopine Ti plasmid- derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. **Nucleic Acids Res. 13:4777-4788.**
25. **Diettrich B., Steup C., Neumann D., Scheibner H., Reinbothe C. y Luckner M. (1986).** Morphogenetic capacity of cell strains derived from filament, leaf and root explants of *Digitalis lanata*. **Plant physiology - Growth and development 124(5): 441-453.**
26. **Domingo J.L., Bordonaba J.G. (2011)** A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. **Environment International 37: 734–742.**
27. **Dominov J.A., Stenzler L., Lee S., Schwarz J.J. y Leisner S. (1992)** Cytokinins and Auxins Control the Expression of a Gene in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells by Feedback Regulation. **The Plant Cell 4(April): 451–461.**
28. **Eckert H., Lavallee B., Schweiger B.J., Kinney A.J., Cahoon E.B. y Clemente T. (2006).** Co-expression of the borage Δ^6 desaturase and the *Arabidopsis* Δ^{15} results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. **Planta 224: 1050–1057.**
29. **Eisenbeiß M., Kreis W. y Reinhard E. (1999).** Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. **Plant physiology and biochemistry 37(1): 13-23.**
30. **Ellstrand N.C. (2003)** Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 358: 1163-1170.**
31. **Ferriar J. (1799).** An Essay on the Medical Properties of *Digitalis purpurea*, or foxglove. **Manchester, Inglaterra.**
32. **Fishman-Lobell J., Rudin N., Haber J.E. (1992)** Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. **Mol. Cell. Biol. 12: 1292–1303.**
33. **Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Gallupi G.R., Goldberg S.B., Hoffman N.L., Woo S.C. (1983)** Expression of bacterial genes in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4803-4807.**

34. **Gagliardi D., Breton C., Chabound A., Vergne P., Dumas C. (1995)** Expression of 7 heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. **Plant Mol Biol** 29:841–856.
35. **Galliano H., Muller A.E., Lucht J.M., Meyer P. (1995)** The transformation booster sequence from *Petunia hybrida* is a retrotransposon derivative that binds to the nuclear scaffold. **Mol. Gen. Genet.** 247: 614–622.
36. **Garve R., Luckner M., Vogel E., Tewes A. y Nover L. (1980).** Growth, morphogenesis and cardenolide formation in long-term cultures of *Digitalis lanata*. **Planta Medica** 40: 92-103.
37. **Gavidia I., Tarrío R., Rodríguez-Trelles F., Pérez-Bermúdez P. y Seitz H. (2007).** Plant progesterone 5 β -reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5 β R from *Digitalis purpurea*. **Phytochemistry** 68(6): 853-864.
38. **Gelvin S.B. (2003)** *Agrobacterium* and plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67: 16–37.
39. **Gidoni D., Srivastava V., Carmi N. (2008)** Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, DOI 10.1007/s11627-008-9140-3.
40. **Giuliano G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P. y Taylor M.A.(2008).** Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. **Trends in Biotechnology** 26(3):139–145.
41. **Hagimori M., Matsumoto T. y Kisaki T. (1980).** Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. **Plant and Cell Physiology** 21(8): 1391-1404.
42. **Hagimori M., Matsumoto T. y Obi Y. (1982a).** Studies on the Production of *Digitalis* Cardenolides by Plant Tissue Culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in liquid media. **Plant Physiol.** 69(3): 653-656.
43. **Hagimori M., Matsumoto T. y Obi Y. (1982b).** Studies on the Production of *Digitalis* Cardenolides by Plant Tissue Culture III. Effects of Nutrients on Digitoxin Formation by Shoot-Forming Cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in Liquid Media. **Plant Cell Physiol.** 23(7): 1205-1211.
44. **Herl V., Fischer G., Müller-Uri F. y Kreis W. (2005).** Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. **Phytochemistry** 67(3): 225-231
45. **Herrera-Estrella L., De Block M., Messens M., Hernalsteens J.P., Van Montagu M. y Schell J. (1983)** Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **EMBO J.** 2: 987-995.
46. **Hills M.J., Hall L., Arnison P.G., Good A.G. (2007)** Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. **Trends Plant Science** 12: 177-183.
47. **Hirotsani M. y Furuya T. (1977).** Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*. **Phytochemistry** 16(5): 610-611.
48. **Hoa T.T.C., Bong B.B., Huq E., Hodges T.K. (2002)** Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. **Theor. Appl. Genet.** 104: 518-525.
49. **Hoess, R.H., Abremski, K. (1985)** Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. **J. Mol. Biol.** 181: 351–362.

50. Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N. (1982) P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 3398–3402.**
51. Hoff, T., Schnorr, K.M., Mundy, J. (2001) A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. **Plant Mol. Biol. 45: 41–49.**
52. Höfgen, R., Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. **Nucl. Acids Res. 16, 9877.**
53. Hohn B., Avraham A. L. y Puchta H. (2001). Elimination of selection markers from transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology 12: 139–143.**
54. Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S. y Hoekema A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research 2(4): 208-218.**
55. Hubel A. y Schoffl F. (1994) *Arabidopsis* heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. **Plant Mol Biol 26:353–362.**
56. Hultén, E. (1968). Flora of Alaska and Neighbouring territories. **Stanford, CA, Stanford University Press.**
- Izquierdo, Y. (2010). Protocolo de Transformación de *Digitalis purpurea* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Máster en Biotecnología vegetal, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 65 p.
57. Izquierdo Y., Pérez-Alonso N. y Jiménez E.A. (2010) Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. **Biotecnología Vegetal 10(3): 131–141.**
58. Jefferson R.A., Kavanagh T.A. y Bevan M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 6:901-907.**
59. Joersbo M. y Okkels F.T. (1996) A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. **Plant Cell Rep 16:219–221.**
60. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., y Angenon G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. **Plant Sci. 122:101-108.**
61. Kaplan J.H. (2005) Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu Rev Biochem 71: 511–35.**
62. Kavita P. y Burma P.K. (2008) A comparative analysis of green fluorescent protein and glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. **Journal of Biosciences 33:337-343.**
63. Kerbach S., Lorz H., Becker D. (2005) Site-specific recombination in *Zea mays*. **Theor. Appl. Genet. 111: 1608–1616.**
64. Khattri A., Nandy S., Srivastava V. (2011) Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. **J. Biosci. 36: 37-42.**
65. Khayat E., Duvdevani A., Lehav E., Ballesteros B.A. (2004) Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection. In: Jain SM, Swennen R (eds) **Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutation. Science Publishers Inc, Plymouth, UK, pp 99–109.**
66. Koncz C. y Schell J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics MGG 204(3): 383-396.**

67. **Kopertekh L., Broer I., Schiemann J. (2009)** Developmentally regulated site-specific marker gene excision in transgenic *B. napus* plants. **Plant Cell Rep. 28: 1075-1083.**
68. **Kopertekh L., Schulze K., Frolov A., Strack D., Broer I., Schiemann J. (2010)** Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. **Plant Mol. Biol. 72: 597-605.**
69. **Kreis W. y Müller-Uri F (2013).** Cardenolide aglycone Formation in *Digitalis*. **T.J. Bach y M. Rohmer (eds.), Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches, DOI 10.1007/978-1-4614-4063-5_29, Springer Science+Business.**
70. **Kumar Anil., Sood A. y Gupta A.K.(1999)***In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort .: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis Micropropagation of gladiolus.**Plant Cell ,Tissue and organ Culture 57: 105–112.**
71. **Li Z., Xing A., Moon B.P., Burgoyne S.A., Guida A.D., Liang H., Lee C., Caster C.S., Barton J.E., Klein T.M. y Falco S.C. (2009)** A *Cre/loxP*- mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. **Plant Mol. Biol. 65: 329-341.**
72. **Liu, H.K., Yang, C., Wei, Z.M. (2005)**Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants. **Plant Sci. 168: 997-1003.**
73. **López-Lázaro M. (2007)** Digitoxin as anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved.**Exp Opin Ther Targets 11:1043–1053.**
74. **Luo K., Sun M., Deng W., Xu S. (2008)** Excision of selectable marker gene from transgenic tobacco using the GM-gene-deletor system regulated by a heat-inducible promoter. **Biotechnol. Lett. 30: 1295–1302.**
75. **Magaña-Gómez J.A., de la Barca A.M. (2009)** Risk assessment of genetically modified crops for nutrition and health.**Nutr. Rev. 67: 1-16.**
76. **Malcolm S. y Zalucki M. (1996).** Milkweed latex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defence paradox.**Entomologia Experimentalis et Applicata 80(1): 193-196.**
77. **Mallory-Smith C. y Zapiola M. (2008)** Gene flow from glyphosate-resistant crops.**Pest Manag. Sci. 64: 428–440.**
78. **Matsunaga E., Sugita K., Ebinuma H. (2002)** Asexual production of selectable marker-free transgenic woody plants, vegetatively propagated species.**Mol. Breed. 10: 95–106.**
79. **Melero C.P., Medarde M. y San Feliciano A. (2000).** A Short Review on Cardiotonic Steroids and Their Aminoguanidine Analogues.**Molecules 5: 51-81.**
80. **Miki B., Abdeen A., Manabe Y., MacDonald P. (2009)** Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome.**Plant Biotechnol. J. 7: 211-218.**
81. **Miki B. y McHugh S. (2004)** Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety.**J. Biotechnol. 107: 193-232.**
82. **MlynárováL., Conner A.J., Nap J.P. (2006)** Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. **Plant Biotechnol. J. 4: 445-452.**
83. **Mok D.W. y Mok M.C. (2001)** Cytokinin metabolism and action. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 89: 89–118.**

84. **Moravčíková J., Vaculková E., Bauer M., Libantová J. (2008)** Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre/loxP strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. **Theor. Appl. Genet.** 117: 1325-1334.
 85. **Muller A. E., Kamisugi Y., Gruneberg R., Niedenhof I.(1999)** Palindromic sequences and A+T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*.**J. Mol. Biol.** 291: 29–46.
 86. **Murashige T. y Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures.**Physiol. Plant.** 15: 473–497.
 87. **Nation Master (2011) disponible en Nation Master.com.** Fecha de consulta: 17 de abril del 2013.
 88. **Neczypor, W. (1969).** Alkaloid content of some native sources of *Vinca minor* L. (evergreen) under field conditions. **Pharmazie** 24(5): 273-274.
 89. **Nelson D.L. y Cox M.M. (2009)** Lehninger Principles of Biochemistry. **5th Edition. Chapter 6.**
 90. **Nesher M., Scpolansky U., Rosen H., Lichstein D. (2007)** The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sci** 80:2093–2107.
 91. **Nishizawa A., Yabuta Y., Yoshida E., Maruta T., Yoshimura K., Shigeoka S. (2006).** Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress.**The Plant Journal** 48, 535–547.
- Occeguera, Z. (2008).** Regeneración de plantas vía embriogénesis somática y estudio de agentes selectivos para la transformación genética de *Digitalis purpurea* L. **Tesis presentada en opción al grado científico de Máster en Biotecnología vegetal, Universidad Central “ Marta Abreu” de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 68 p.**
92. **Oficina Nacional de Estadística de la República de Cuba (2011) disponible en www.one.cu.** Fecha de consulta: 17 de abril del 2013.
 93. **Orel N., Kyryk A., Puchta H. (2003)** Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome.**Plant J.** 35: 604-612.
 94. **Ow D.W. (2007).** GM maize from site-specific recombination technology, what next?**Curr. Opin. Biotechnol.** 18: 115-120
 95. **Padilla I.M.G. y Burgos L. (2010)**Aminoglycoside antibiotics: structure , functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols.**Plant Cell Reports** 29: 1203–1213.
 96. **Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A., Jahn A., Nitzsche H.M., Kerns G., Capote-Perez A. y Jiménez E.A. (2009).**Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 99: 151–156.
 97. **Pérez-Bermúdez P., Brisa M.C., Cornejo M.J. y Segura J. (1984).** *In vitro* morphogenesis from excised leaf explants of *Digitalis obscura* L. **Plant Cell Reports** 3: 8-9.
 98. **PLANTS Profile Disponible en:** <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=DIPU>. Fecha de consulta: 17 de abril del 2013.
 99. **Prassas I. y Diamandis E.P. (2008)** Novel therapeutic applications of cardiac glycosides.**Nat Rev Drug Discov** 7:926–935.
 100. **Puchta H.(2003).** Marker-free transgenic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 74: 123–134, 2003. 123.

101. Radzyukevich T.L., Lingrel J.B. y Heiny J.A. (2009). The cardiac glycoside binding site on the Na⁺, K⁺-ATPase 2 isoform plays a role in the dynamic. *PNAS* 106(8): 2565–2570.
102. Ramana-Rao M. V., Parameswari Ch., Sripriya R., Veluthambi K. (2011). Transgene stacking and marker elimination in transgenic rice by sequential *Agrobacterium*-mediated co-transformation with the same selectable marker gene. *Plant Cell Reports* 30: 1241-1252.
103. Ramessar K., Peremarti A., Gómez-Galera S., Naqvi S., Moralejo M., Muñoz P., Capell T., Christou P. (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Res.* 16: 261-280.
104. Rashotte A.M., Carson S.D., To J.P., Kieber J.J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1998–2011.
105. Renobales, G. (2001). Plantas de interés farmacéutico. 72 especies presentes en la península ibérica. Consultado 2/5/2008, <http://www.vc.ehu.es/plfarm/>.
106. Repke K.R.H., Schönfeld W., Weiland J., Megges R. y Hache A. (1989). Design of Enzyme Inhibitors as Drugs. Oxford, Inglaterra, Oxford University Press: 435-502.
107. Richard S.C., Orduñez P., Iraola Ferrer, Bernal J.L y Espinosa-Brito A. (2006) Cardiovascular Disease and Associated Risk Factors in Cuba: Prospects for Prevention and Control. *Am J Public Health.* 2006 January; 96(1): 94–101.
108. Roca-Pérez L., Boluda R.I, Gavidia I., Pérez-Bermúdez P. (2004) Seasonal cardenolide production and Dop5βr gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry* 65:1869-1878.
109. Roig J. T. (1974). Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana, Cuba, Editorial Ciencia y Técnica, Instituto del Libro.
110. Russell S.H., Hoopes J.L., Odell J.T. (1992) Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* 234: 49–59.
111. Saito K., Yamazaki M., Shimomura K., Yoshimatsu K., Murakoshi I. (1990) Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Reports* 9: 121-124.
112. Sales E., Frieder M., Nebauer S. G., Segura J., Kreis w. y Arrillaga I. (2011) *Digitalis*. C. Kole (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops*, DOI 10.1007/978-3-642-21201-7, Springer-Verlag.
113. Sales E., Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I. y Segura J. (2007). Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Medica* 73: 605-610.
114. Sales E., Nebauer S.G., Arrillaga I. y Segura J. (2002). Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Journal of Plant Physiology* 159(1): 9-16.
115. Sales E., Segura J. y Arrillaga I. (2003). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Planta Medica* 69: 143-147.
116. Sato Y. y Yokoya S. (2008). Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* 27: 329–334.

117. Scharf K.D., Rose S., Zott W., Schoff F., Nover L. (1990) Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO J* 9:4495–4501.
118. Senecoff J.F., Bruckner R.C., Cox M.M. (1985) The FLP recombinase of the yeast 2- μ plasmid: characterization of its recombination site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7270-7274.
119. Shakeel S.N., Noor U.I. y Haq S. (2012). Analysis of gene sequences indicates that quantity not quality of chloroplast small HSPs improves thermotolerance in C4 and CAM plants. *Plant Cell Reports*: 1943–1957 doi10.1007/s00299-012-1307-z.
120. Shoji T., Kato K., Sekine M., Yoshida K, y Shinmyo A.(2000). Two types of heat shock factors in cultured tobacco cells. *Plant Cell Reports* 19: 414–420.
121. Siebert R. y Puchta H. (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* 14: 1121–1131.
122. Sreekala C., Wu L., Gu K., Wang D., Tian D.Z. (2005) Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated CRE//loxP system. *Plant Cell Rep.* 24: 86-94.
123. Stuhlemmer U. y Kreis W. (1996). Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata*. *Plant Physiol Biochem* 34: 85-91.
124. Sugita K., Kasahara T., Matsunaga E., Ebinuma H. (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J.* 22: 461–469.
125. Sun N., Liang J., Abil Z., Zhao H. (2012) Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst* 8: 1255–1263.
126. Tewes A., Wappler A., Peschke E.M., Garve R. y Nover L. (1982). Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*. *Z. Pflanzenphysiol* 106: 311-324.
127. Thomas R., Gray P. y Andrews J. (1990). *Digitalis*: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Advances in Drug Research* 19: 311-562.
128. Thomson J.G., Yau Y.Y., Blanvillain R., Chiniquy D., Thilmony R., Ow D.W. (2009) ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from the Arabidopsis genome. *Transgen Res.* 18:237-248.
129. Upadhyaya C., Nookaraju A., Gururani M., Upadhyaya Ch., Kim D., Chun S. y Park S. (2010). An update on the progress towards the development of marker-free transgenic plants. *Botanical Studies* 51: 277–292.
130. van den Eede G., Aarts H., Buhk H.J., Corthier G., Flint H.J., Hammes W., Jacobsen B., Midtvedt T., van der Vossen J., von Wright A., Wackernagel W., Wilcks A. (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from GM plants. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1127–1156.
131. Verweire D., Verleyen K., De Buck S., Claeys M., Angenon G. (2007) Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiol.* 145: 1220-1231.
132. Wang Y., Yau Y-Y, Perkins-Balding D., Thomson J.G. (2011). Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Reports* 30: 267-285.

133. Wang W., Hu Y., Sun D., Staehelin C., Dawei X., Xie J. (2012) Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.) **Mol. Biol. Rep.** 39:451-459.
134. Wang Y., Chen B., Hu Y., Li J., Lin Z. (2005) Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system. **Transgenic Res.** 14: 605–614.
135. Wang Y., Yau Y.Y., Perkins-Balding, D., Thomson, J.G. (2011) Recombinase technology: applications and possibilities. **Plant Cell Rep.** 30: 267–285.
136. Withering W. (1785). An account of the introduction of foxglove into medical practice. **Londres, Inglaterra.**
137. Wu X.B., Wang J., Liu J.H., Deng X.X. (2009) Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **J Plant Physiol** 166:52–62. doi:10.1016/j.jplph.2008.02.00.
138. Yamanouchi U., Yano M., Lin H., Ashikari M. y Yamada K. (2002) A rice spotted leaf gene Spl7, encodes a heat stress transcription factor protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 7530– 7535.
139. Yoder J.I. y Goldsbrough A.P. (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. **Bio-Technology** 12: 263-267.
140. Yoo S.Y., Bomblies K., Yoo S.K., Yang J.W., Choi M.S., Lee J.S., Weigel D., Ahn J.H. (2005) The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. **Planta** 221: 523-530.
141. Yu C., Zhang J., Peterson T. (2011) Genome rearrangements in maize induced by alternative transposition of reversed Ac/Ds termini. **Genetics** 188: 59 – 67.
142. Zhang W., Subbarao S., Addae P., Shen A., Armstrong C., Peschke V., Gilbertson L. (2003) Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1157–1168.
143. Zhang Y., Li H., Ouyang B., Lu Y., Ye Z. (2006) Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. **Biotechnol. Lett.** 28: 1247-1253.
144. Zheng X.L., Deng W., Luo K.M., Duan H., Chen Y.Q., McAvoy R., Song S.Q., Pei Y., Li Y. (2007) The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. **Plant Cell Rep.** 26: 1195-1203.
145. Zhou Y., Huhui P, y Pu C. (2012) NnHSP17 . 5 , a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera* , contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports** 31: 379–389.
146. Zou J., Cuifang L. y Xinbo C. (2011) Proteomics of rice in response to heat stress and advances in genetic engineering for heat tolerance in rice. **Plant Cell Reports** 30: 2155–2165.
147. Zubko E., Scutt C., Meyer P. (2000) Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. **Nat. Biotechnol.** 18: 442–445.
148. Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G., Chua N.H. (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. **Nat. Biotechnol.** 19: 157–161.